

東京電機大学

博士論文

アポトーシス関連タンパク質 7A6 抗原のミトコンドリア移行における
カスパーゼ-6 の関与の解析

Analysis of involvement of caspase-6 in the mitochondrial transition of
apoptosis-related protein, 7A6 antigen

平成 29 年 9 月

氏名 吹田 博章

目次

第1章 緒言

1-1. プログラム細胞死	3
1-2. カスパーゼ	
1-2-2. 外因性経路とカスパーゼ	9
1-2-3. 内因性経路とカスパーゼ	13
1-2-4. エフェクターカスパーゼ	
1-2-4-1. カスパーゼ-3	16
1-2-4-2. カスパーゼ-7	19
1-2-4-3. カスパーゼ-6	21
1-3. Bcl-2ファミリー	23
1-4. 7A6抗原	25

第2章 抗 Fas 抗体によるカスパーゼ依存アポトーシスの誘導の検証と 7A6 抗原のミトコンドリア局在の確認

2-1. 背景	27
2-2. 実験方法	
2-2-1. 細胞培養	29
2-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法	29
2-2-3. ウェスタンブロット法	29
2-2-4. アガロース電気泳動による DNA 断片化の検出	30
2-2-5. フローサイトメトリー	30
2-2-6. 共焦点顕微鏡	30
2-2-7. 統計解析	31
2-3. 結果	
2-3-1. ウェスタンブロット法による抗 Fas 抗体と汎カスパーゼ阻害剤 z-Asp-CH ₂ -DCB の作用	31
2-3-2. アガロース電気泳動による DNA ラダーの検出	32
2-3-3. 共焦点顕微鏡による 7A6 抗原の検出	33
2-3-4. フローサイトメトリーによる 7A6 の検出	34
2-4. 考察	35

第3章 抗 Fas 抗体によるカスパーゼの活性化と阻害剤による活性化阻害

3-1. 背景	37
3-2. 実験方法	
3-2-1. 細胞培養	37
3-2-2. 細胞に対する薬剤作用方法	38
3-2-3. ウェスタンブロット法	38

3-2-4. 蛍光基質を用いたカスパーゼ活性測定	38
3-2-5. アガロース電気泳動による DNA 断片化の検出	38
3-3. 結果	
3-3-1. ウェスタンブロット法によるカスパーゼ切断生成物の検出.....	38
3-3-1-1. カスパーゼ-3 の切断生成物の検出.....	40
3-3-1-2. カスパーゼ-7 の切断生成物の検出.....	40
3-3-1-3. カスパーゼ-6 の切断性世物の検出.....	40
3-3-2. DNA 断片化の検出	40
3-3-3. 蛍光基質によるカスパーゼ活性の検討.....	41
3-4. 考察.....	43
第 4 章 カスパーゼ阻害剤による 7A6 抗原のミトコンドリア局在の解析	
4-1. 背景.....	45
4-2. 方法	
4-2-1. 細胞の培養.....	45
4-2-2. MCF7 細胞に対する薬剤の作用方法	45
4-2-3 フローサイトメトリーによる 7A6 抗原の検出	45
4-3. 結果	
4-3-1. カスパーゼ阻害による 7A6 の阻害.....	46
4-3-2. 7A6 の検出量と p20p10 カスパーゼ-6 の生成量の相関性.....	46
4-3-3. ウェスタンブロット法によるカスパーゼ切断生成物の検出.....	48
4-3-4. カスパーゼ阻害剤による 7A6 の解析.....	49
4-3-5. カスパーゼ-3 欠損細胞を用いた 7A6 解析	50
4-4. 考察.....	51
第 5 章 カスパーゼ-6 ノックダウンに伴う 7A6 抗原のミトコンドリア局在抑制	
5-1. 背景.....	53
5-2. 方法	
5-2-1. 細胞培養.....	54
5-2-2. 細胞への siRNA 導入	54
5-3. 結果	
5-3-1. カスパーゼ-6 の siRNA によるノックダウン.....	54
5-3-2. カスパーゼ-6 ノックダウンによる 7A6 の ミトコンドリア局在の解析	55
5-4. 考察.....	56
第 6 章 総合討論.....	57
謝辞.....	66
参考文献.....	67

第1章 緒言

1-1. プログラム細胞死(アポトーシス)

生体は細胞から構成されているが、自身の正常な生存の手段として細胞死を誘導することが知られている。アポトーシスが正常に誘導されないと、癌などの疾患につながることも知られている。よってアポトーシスの研究は医学の面でも活発である。本研究ではアポトーシス時にミトコンドリアに局在する新規のタンパク質を解析しアポトーシスの更なる理解を進めることを目的とした。

アポトーシスの歴史は、1885年に **Flemming** はラットの卵胞に、染色体の凝縮、分断した死細胞を観察した(1)。これが最初に報告されたアポトーシスといわれている。1948年頃に **Saunders** は、ニワトリ胚の細胞死が常に同じ領域で起こることを見出した。さらに1966年に細胞死領域を培養系に移しても同じように細胞死が誘導されることを確認したが、胚の別の場所に移植すると細胞死が誘導されなくなることも見出した(2)。 **Lockshin** は昆虫の変態において同様の細胞死を観察しており、1964年にプログラム細胞死と名付けた(3)。

肝虚血におけるリソソームの形態変化を研究していた **Kerr** は、急性期にみられる膨潤および破裂したネクローシス細胞のほかに小さくばらばらになった染色体をもつ死細胞を見出し、1972年にこのような細胞死をアポトーシス(apoptosis)と名付けた(4)。

プログラム細胞死(アポトーシス)の過程に関与する機構は、からだの構成が単純であり、細胞数の比較的少ない線虫を実験材料にして研究が発展した。1977年に **Sulston** と **Brenner** と **Horvitz** は、線虫を組織する1090個の体細胞は成体を形成するにあたって、特定の131個の細胞は細胞死を起こし、線虫間で不変であることを見出した。このプログラム細胞死も染色体の凝縮などのアポトーシスの特徴を有していた。さらに、遺伝的な解析によって1982年には細胞死に異常のある変異体 *ced* が10種類単離された。これによってプログラム細胞死が遺伝的支配を受けることが証明された(5)。この研究は2002年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。線虫のプログラム細胞死(アポトーシス)に関係する遺伝子及び誘導機構を図1に示す。

ces-2 —| *ces-1* —| *egl-2* —| *ced-9* —| *ced-4* → *ced-3* → プログラム細胞死

死細胞 → 貪食

ced-1
ced-2
ced-5
ced-6
ced-7
ced-10

図1 線虫の遺伝解析より判明したプログラム細胞死(アポトーシス)のシグナル経路

ced-3, *-4* は細胞死に必須の遺伝子であり、*ced-4* は *ced-3* を活性化させ、*ced-3* が細胞死を実行する。*ced-9* は *ced-4* を抑制し細胞死を抑制している。*egl-1* は *ced-9* を抑制し細胞死を促進する。*ced-1*, *-2*, *-5*, *-6*, *-7*, *-10* の翻訳するタンパク質は不明であるが、欠損すると死細胞の貪食に影響が出ることが示された。

ced-3 は細胞死の実行因子であり、*ced-4* は *ced-3* の活性化因子、*ced-9* は *ced-4* の抑制因子であることが分かった。また、*ced-1*, *-2*, *-5*, *-6*, *-7*, *-10* は死細胞の貪食に係わる因子であることが分かった。*ced* の後に同定された *egl-1* は *ced-9* を抑制し細胞死を誘導することが分かった。転写因子の *ces-1* は *egl-1* の抑制に働き、*ces-2* は *ces-1* を抑制する因子であると考えられている。*ced-8* は細胞死の効率に係わっていると考えられている(5, 6, 7)。

上記の研究により、プログラム細胞死=アポトーシスの考えが広まっていったが、現在はサイトカインの作用、DNA の損傷、ミトコンドリアからのシトクロム *c* の放出などによるアポトーシスの活性化経路も確認され、アポトーシスはプログラム細胞死だけではないと認識されるに至っている(8)。

哺乳類細胞においてもアポトーシスは形態形成、不要な細胞や組織の除去、細胞数の調節など組織中の細胞集団を維持する恒常的機構としても起こる(図2)。

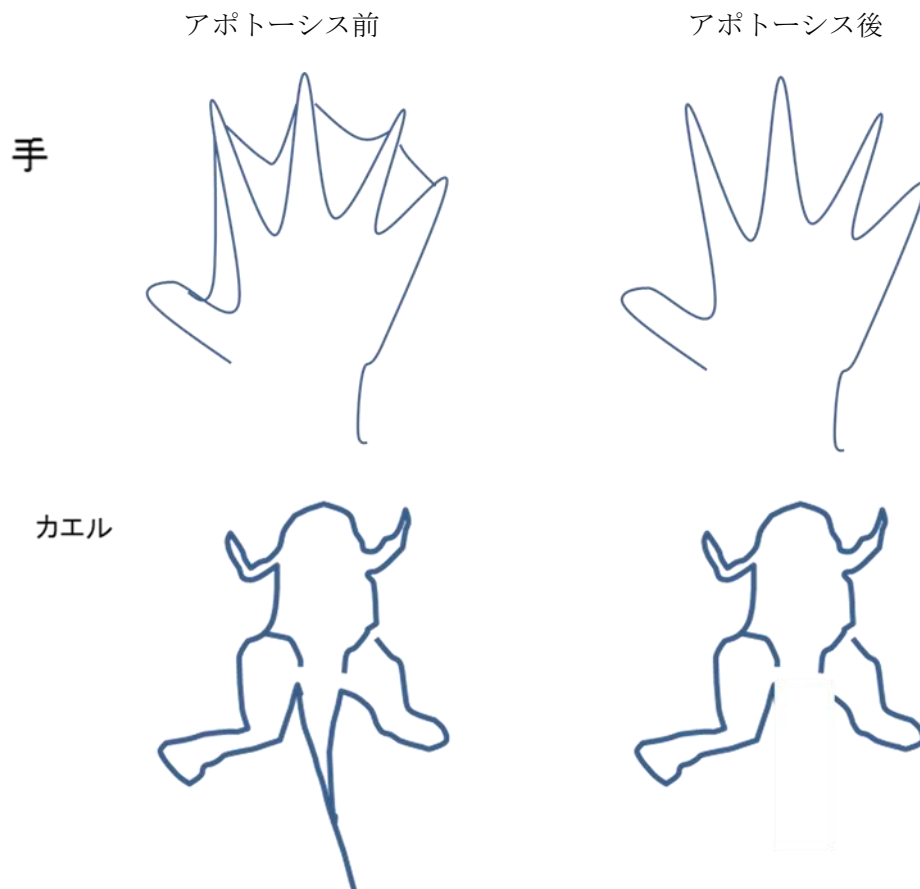


図 2 発生におけるアポトーシスの例

ヒトの初期の指の間には水カキのようなものがついているが、アポトーシスによって除去され、指が形成される。カエルの尻尾も成体に近づくにつれアポトーシスによって失う。

さらに、アポトーシスは免疫反応におけるような防御機構として、または細胞が疾患もしくは有害物質によって損傷した場合にも起こることが確認されている(9)。よってアポトーシス異常は様々な疾患につながる。アポトーシスの低下は癌(10, 11, 12)、自己免疫疾患(13)、および持続性ウイルス感染に関連し(14)、アポトーシスの過剰活性化は、アルツハイマー病(15) および虚血性心不全(16) などの多くの形態の神経変性疾患に関連することが報告されている。

アポトーシスは形態学的に定義されたが、特徴としては細胞の収縮、変形及び隣接する細胞との剥離、クロマチンの凝縮、核の変形からの核膜崩壊、DNA の断片化、そして最終的にはアポトーシス小体と呼ばれる細胞質ゾル、凝縮したクロマチンおよびオルガネラを含むコンパクトな膜密閉構造に断片化することが確認されている(4)。ネクローシスはアポトーシスとは対照的に細胞膜の完全性の喪失、細胞の膨張及び破壊をもたらし、細胞内の炎症性物質などを放出し周囲の細胞の炎症を誘導する(図 3)(4)。

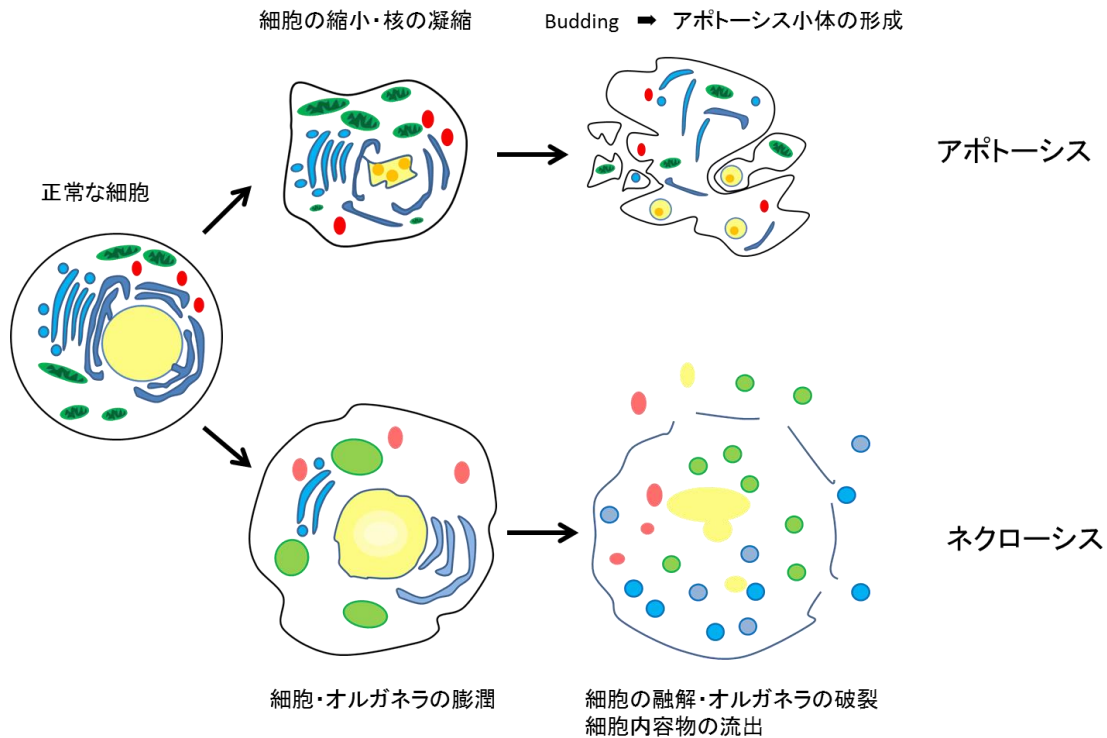


図3 アポトーシスおよびネクローシス細胞死の特徴

アポトーシスは、細胞小器官、細胞質ゾルおよび核断片を含む膜結合アポトーシス小体の最終的な形成を伴う核周囲における細胞収縮、クロマチン凝縮を含み、炎症プロセスを引き起こさずに貪食される。ネクローシス細胞は膨潤し、炎症性物質を含む内容物を周囲に放出して炎症を引き起こす。

アポトーシス細胞は膜の構造が維持されているため炎症性物質の放出が無く、マクロファージに貪食され除去される(17)。ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 細胞より分化させたマクロファージ様細胞の貪食実験では、アポトーシスを誘導した Jurkat 細胞はネクローシスを起こした Jurkat 細胞に比べ貪食が有意に上昇することが示された(18)。

アポトーシスは線虫などの比較的単純な多細胞生物から広範囲な種類の動物細胞で観察され、ヒトにおいてもアポトーシス不全は様々な疾患につながることから医学面でも研究が盛んな分野でもある。

1-2. カスパーゼ

1-2-1. カスパーゼの特徴

アポトーシスを実行するにあたって重要視されているシステインプロテアーゼがあり、カスパーゼ(cysteine aspartic acid ase)と呼ばれている。実際、アポトーシス誘導時には活性化が認められ、アポトーシスとカスパーゼは密接に関係している。

現在は 14 種が同定されており、このうちカスパーゼ-11, -12 はマウスでのみ同定され、カスパーゼ-13 はウシでのみ同定されている(19)。

ヒトのカスパーゼのうちアポトーシスに係わるカスパーゼは、カスパーゼ-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 であり、カスパーゼ-1, -4, -5 は炎症誘導に係わっていると考えられている(19)。カスパーゼ-14 は皮膚の防御機構に係わっていると考えられている(20)。さらにアポトーシスを誘導するカスパーゼはイニシエーターカスパーゼ(カスパーゼ-2, -8, -9, -10) (アポトーシスを開始する)とエフェクターカスパーゼ(カスパーゼ-3, -6, -7) (アポトーシスを実行する)に分けられている(19)。

カスパーゼは合成時は不活性化型のチモーゲンとして合成されプロカスパーゼとも呼ばれる。図 4 に示すように構造は N 末端側に活性化の抑制に働いていると考えられているプロドメインがあり、続いて大サブユニットから小サブユニットと続く。活性化時にはプロドメイン、大サブユニット、小サブユニットがそれぞれ切断され大サブユニット 2 つと小サブユニットのテトラマーを形成する。活性化したカスパーゼは基質を分解しアポトーシスを進行させていく。通常、カスパーゼはイニシエーターカスパーゼからまず活性化する。引き続きイニシエーターカスパーゼがエフェクターカスパーゼを活性化する。このため一連の流れはカスパーゼカスケードと呼ばれている。エフェクターカスパーゼは特異的な基質を分解、および活性化させアポトーシスを誘導することが明らかになっている(21, 22, 23)。

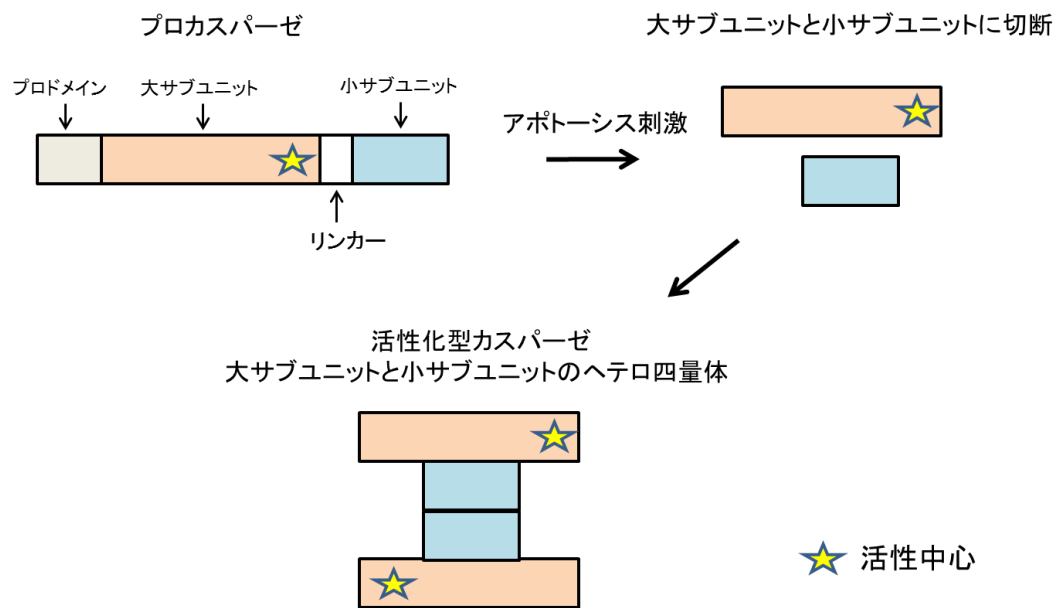


図4 カスパーゼの活性化機構

カスパーゼは刺激に応じて大サブユニットと小サブユニットに切断され、ヘテロ四量体となって活性化型となることが示唆されている。

1-2-2. 外因性経路とカスパーゼ

アポトーシスを誘導するにあたって、外因性経路(デスレセプター依存経路)および内因性経路の二つのシグナル伝達経路がよく知られている(24)。デスレセプターは細胞膜に局在し、可溶性または膜結合デスリガンドによって活性化される(24)。今日まで同定されたりガンドおよび対応するデスレセプター(リガンド/レセプター)は、FasL / Fas(25)、tumor necrosis factor(TNF)- α / TNFR1 (26)、Apo3L / DR3 (27)、Apo2L / DR4(28)および Apo2L / DR5(29)などであり、このなかで FasL / Fas および TNF- α / TNFR1 が最もよく研究されている。

Fas リガンドは TNF に類似の 40kD の II 型膜貫通タンパク質(C 末端が細胞外に配向)である(30)。Fas リガンドの細胞内領域は約 80 のアミノ酸からなり、プロリンリッチの配列がヒト、マウス、ラットを通じてよく保存されている。細胞外領域は 179 のアミノ酸からなり、C 末端側の約 150 のアミノ酸領域は、TNF ファミリーのメンバーと顕著な相同性を示す。またこの領域は TNF と同様、マトリックスメタロプロテアーゼ様の酵素によって切断され、可溶性 FasL を生成する(30)。可溶性 FasL はマウスでは不活性でありヒトでは活性があるが、膜結合型の FasL に比べ活性は弱く、標的の種類も限られている(31)。

Fas (Apo-1/CD95) は TNF レセプターファミリーに属する細胞膜貫通レセプターで、Fas リガンドや抗 Fas 抗体が結合するとカスパーゼ依存的にアポトーシスを誘導する(32)。

Fas の細胞外領域にはシステインリッチドメイン (CRD) があり、細胞内領域にはアポトーシスの誘導に必須な領域があり death domain(DD)と呼ばれている。DD は、デスシグナルを細胞に伝達するアダプター分子に結合する(33)。FasL はホモ三量体となって活性を持つ(34)。受容体の結合は C 末端に局在し、自己会合モチーフはリガンドの細胞外ドメインの N 末端に局在している。機能的に活性な形態のリガンドの発現は、転写レベルならびにメタロプロテアーゼによる切断によって高度に調節される。Fas / Fas リガンドは末梢免疫系の活性化細胞を除去するので、この経路の欠陥は自己免疫疾患の原因となる(36)。

Fas の活性化は Fas リガンドによる受容体の三量体化が引き金になって、Fas の DD に FADD (Fas-associated protein with death domain)と呼ばれる分子が結合する(33)。これらの分子はデスレセプターとカスパーゼとの橋渡しをする分子であることから、アダプターと呼ばれる。アダプター分子も DD を持ち、DD-DD 相互作用でデスレセプターや他のアダプター分子と結合する。FADD の N 末端側には、カスパーゼ-8 およびカスパーゼ-10 が結合することができる。カスパーゼ-8、-10 の N 末端側には FADD の末端側と共通のモチーフ(death effector domain, DED) が二つ存在し、DED-DED 相互作用で FADD と結合し DISC(death-inducing signaling complex)を形成する。DISC 中のカスパーゼ-8 および-10 のオリゴマー化は、自己活性化する(図 5)。

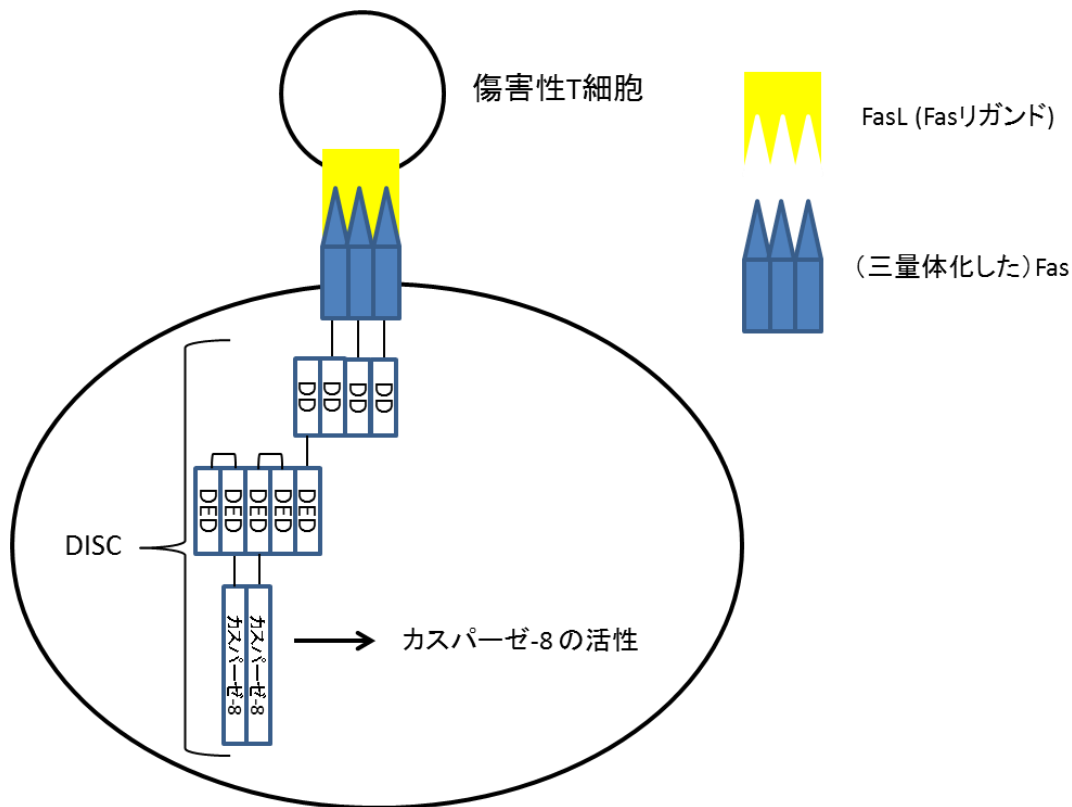


図5 Fas シグナル伝達機構

Fas は FasL によって三量化しシグナルを伝える。DISC と呼ばれる構造を形成しプロカスパーゼ-8 を二量化させる。二量化したプロカスパーゼ-8 は自己活性化する。

プロカスパーゼ-8 は二つのアイソフォーム（プロカスパーゼ-8a およびプロカスパーゼ-8b）が存在し DISC に結合することが報告されている(36)。プロカスパーゼ-8a / b は、2 つのタンデム DED ドメインならびに触媒サブユニット p18 および p10 を有する(図 6)。プロカスパーゼ-8a / b の活性化は、DISC でのオリゴマー化によって起こると考えられている。プロカスパーゼ-8a / b は CD95 DISC でホモ二量体を形成することが示されているが、二量化が活性化の前提条件であると考えられている。さらに、プロカスパーゼ-8 活性化の中間二量体モデルによれば、各プロカスパーゼ-8 ホモダイマーは別のプロカスパーゼ-8 ホモ二量体を活性化する。したがって、DISC 構造は、2 つのプロカスパーゼ-8 ホモ二量体が近接してプロカスパーゼ-8 の初期活性化をもたらす。二量化の際の DISC でのプロカスパーゼ-8 の最初の活性化に続いて、その後のプロカスパーゼ-8a / b の切断が続く。このプロセッシングは、プロドメインと大小の触媒サブユニットとの間に位置する Asp 残基で起こる(図 6)。さらにプロドメインと大小の触媒サブユニットとの間の切断が同時に起こる。カスパーゼ-8 に分解産物は p43 / p41、p26 / p24、CAP3、p30、p18 および p10(図 6)であるが、最初の切断では、N 末端 p43 / p41 および C 末端 p30 切断産物が生成される。重要

なことに、これらの切断生成物は既に触媒活性を有する。第2の切断工程は、p43 / p41 および p30 がそれぞれ p10 および p18 にプロセッシングされ、活性カスパーゼ-8 ヘテロ四量体 (p18 / p10) の生成をもたらす。切断後、カスパーゼ-8 は完全に活性化され、アポトーシス基質、例えばカスパーゼ-3 および BH3 interacting domain death agonist (Bid) を切断することができる。プロカスパーゼ-8 活性は、プロカスパーゼ-8 プロセッシングの開始に必要なであるが、活性カスパーゼ-8 はアポトーシスを誘導する(36)。

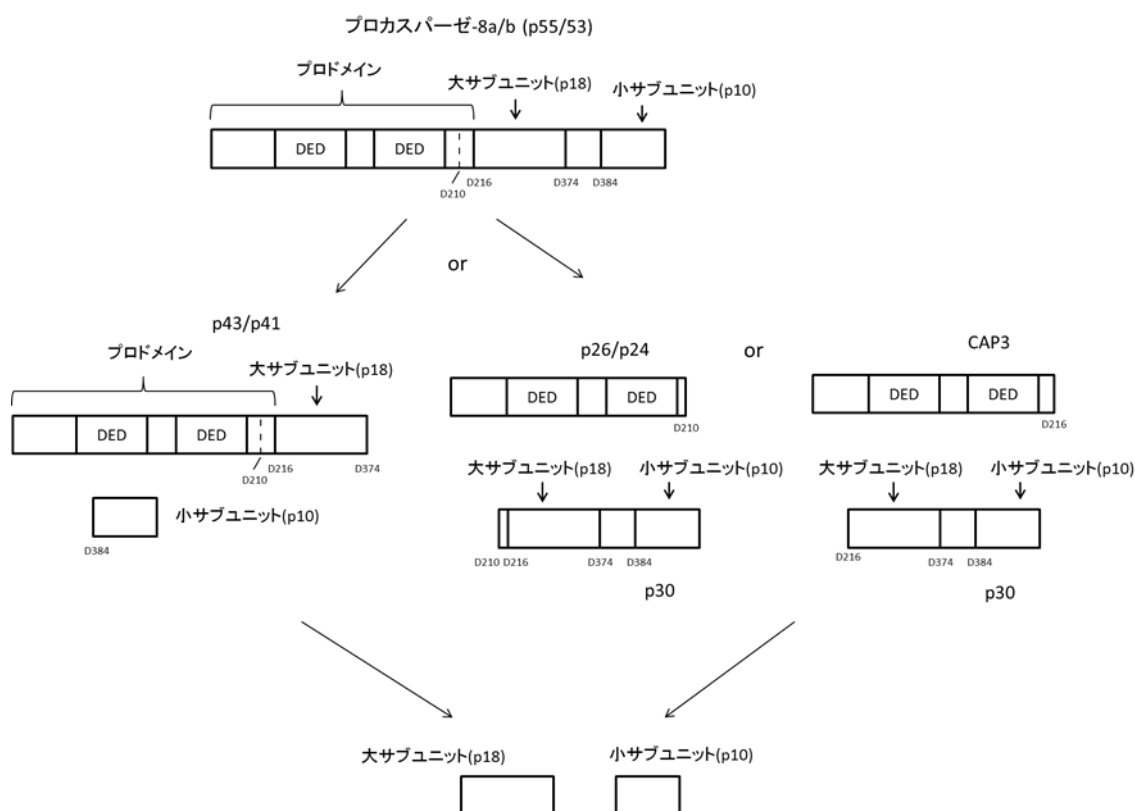


図6 カスパーゼ-8 の活性化スキーム

プロカスパーゼ-8 に刺激が加わると特定の位置で切断を受ける。最終的には p18 と p10 が生成するとヘテロ四量体を形成し活性化する。

Cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) は、Fas 誘導アポトーシスにおいてカスパーゼ-8 を抑制するタンパク質であり、3 つの c-FLIP アイソフォームおよび 2 つの切断産物がこれまでに特徴付けられている。

3 つの c-FLIP アイソフォームは、それぞれ c-FLIPL (Long)、c-FLIPS (Short) および c-FLIPR (Raji) である(37) (図 7)。3 つのアイソフォームはすべて 2 つの DED ドメインを

有し、DISC に結合することができる。短い FLIP アイソフォームの **c-FLIPS** および **c-FLIPR** は、プロカスペーゼ-8 の活性化およびアポトーシスを抑制する。**c-FLIPL** もアポトーシスの抑制に働くが、DISC 中で高濃度に存在する場合は **c-FLIPS** と同様に抗アポトーシス分子として作用することが報告されている(38)。

c-FLIP は 2 つの切断産物、**p43-FLIP** および **p22-FLIP** が報告されている (図 7)。**p43-FLIP** は、D376 でのプロカスペーゼ-8 切断の結果として DISC で **c-FLIPL** から生成される。**p22-FLIP** は、D196 でのプロカスペーゼ-8 切断から生じる **c-FLIP** の N 末端切断産物である。**p43-FLIP** とは対照的に、**p22-FLIP** は、Fas 刺激とは無関係にサイトゾル中で形成される。

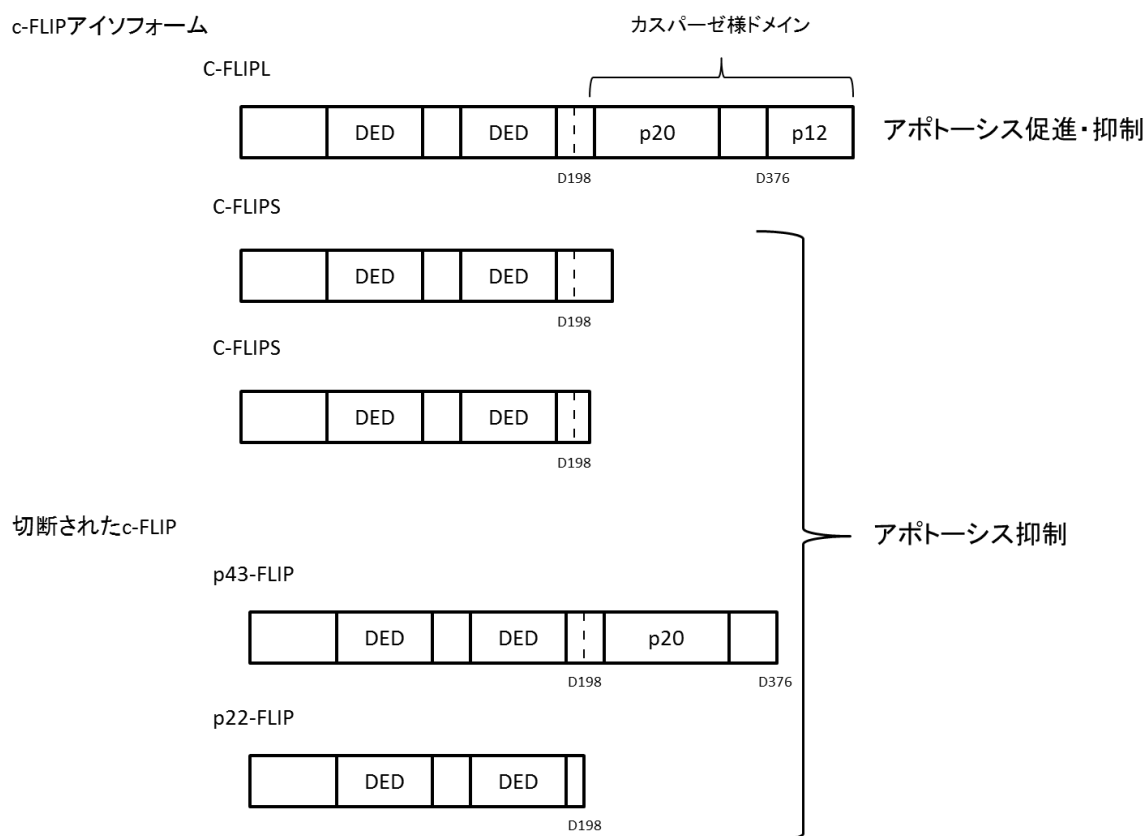


図 7 **c-FLIP** の機能

c-FLIP アイソフォームおよび **c-FLIP** 切断産物。**c-FLIPL** のカスパーゼ様ドメインには活性はない。**C-FLIP** は通常カスパーゼ-8 の活性化を阻害しアポトーシスを抑制するが **c-FLIPL** は促進に傾く場合もある。

1-2-3. 内因性経路とカスパーゼ

外因性経路に対して内因性経路はミトコンドリア依存経路とも呼ばれるが、細胞の損傷またはストレスによって誘導される。アポトーシス性のミトコンドリア刺激はミトコンドリア透過性移行(Mitochondrial membrane Permeability Transition, MPT)細孔の開口、ミトコンドリア膜電位の喪失およびアポトーシス促進タンパク質のサイトゾルへの放出をもたらす(39)。アポトーシス促進タンパク質はシトクロム c、second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI (Smac/DIABLO)、およびセリンプロテアーゼ high-temperature requirement A2(HtrA2)/Omi からなる(40)。これらのタンパク質は、カスパーゼ依存性ミトコンドリア経路を活性化する。シトクロム c は Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)と同様にプロカスパーゼ-9 と結合して活性化し、アポトソーム を形成することでカスパーゼ-9 活性化が起こる(41)。 Smac / DIABLO および HtrA2 / Omi は、Inhibitors of apoptosis proteins (IAP) 活性を阻害することによってアポトーシスを促進することが報告されている(42)。

活性化したカスパーゼ-9 は下流のエフェクターカスパーゼを活性化させる。アポトソームおよび DISC は、それぞれのイニシエーターカスパーゼを活性化してアポトーシス経路を開始する共通の機能を有するが、アポトソームは DISC とは非常に異なる分子機構を有する(図 8)。

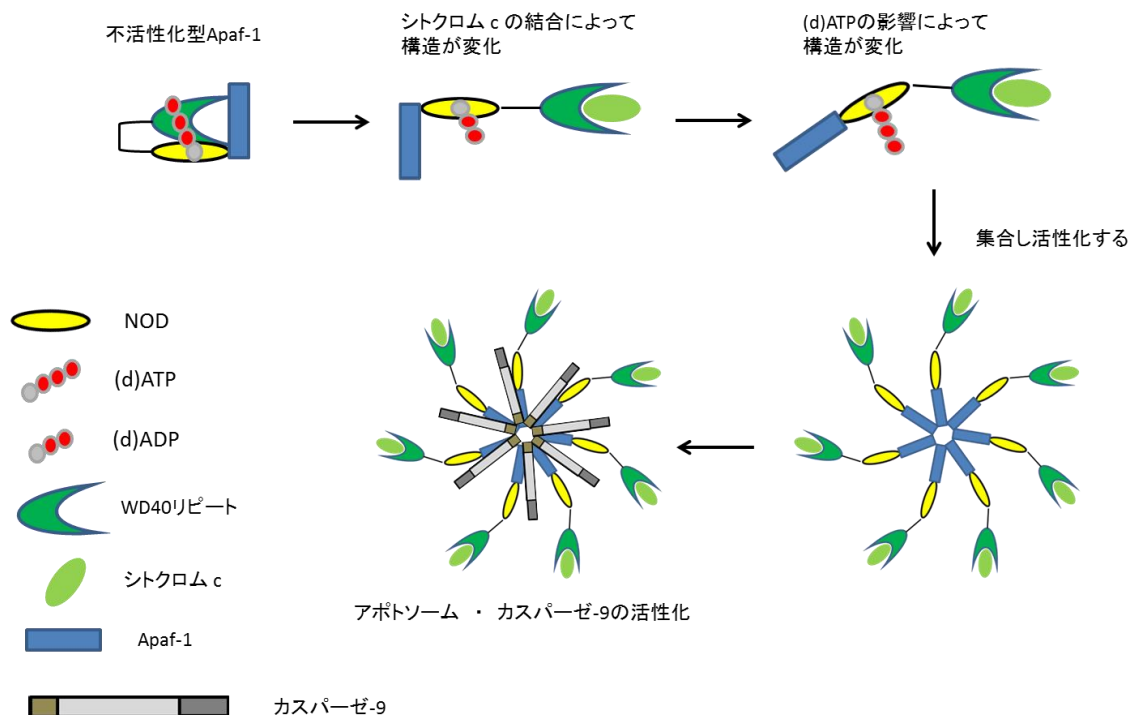


図8 Apaf-1 とカスパーゼ-9 の活性化

ミトコンドリアから放出されたシトクロム c は Apaf-1 と結合し、ATP 依存的に構造を変化させる。さらに Apaf-1 は 7 量体化しカスパーゼ-9 と複合体を形成し、カスパーゼ-9 を活性化させる。

Apaf-1 は、N 末端にカスパーゼと結合できる領域を含むマルチドメインアダプタータンパク質であり、ヌクレオチド結合およびオリゴマー化ドメイン、および 7 ブレードプロペラを形成する WD40 repeat region (WDR) からなる。Apaf-1 は、ATP が結合した不活性化モノマーとして存在している(43)。しかし、シトクロム c がその WDR (おそらく β -プロペラ間) に結合すると、Apaf-1 は ATP 加水分解によってコンフォメーション変化を起こし活性化すると考えられる。複合体は 7 つの Apaf-1 を含み、caspase recruitment domain (CARD) はオリゴマー化 nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) からなる中央ハブの真上に位置するリングを形成することが示唆されている。プロカスパーゼ-9 が Apaf-1 に結合すると、Apaf-1 とプロカスパーゼ-9 の両方の CARD は中央ハブの上にある柔軟な繋ぎの「ディスク」を形成し、各 WDR ドメインは超ヘリックスドメインを介して中央ハブに接続されると考えられている。全体として、これは、7 つの曲がったスポークが中心ハブから外側に放射状になり、プロカスパーゼ-9 (またはそれらの CARD) が複合体の頂部に位置するようなホイール様の分子を形成する(41, 43)。

ヌクレオチド交換後に起こるコンフォメーション変化は、Apaf-1 中の CARD を曝露するので、そのオリゴマー化は、得られたアポトソームへのプロカスパーゼ-9 の動員に結合する。先に述べたように、プロカスパーゼ-9 のようなイニシエーターカスパーゼは、アダプタータンパク質との相互作用を促進する長いプロドメインを有する。カスパーゼ-2、-8 および-10 を含む他のイニシエーターカスパーゼとは異なり、カスパーゼ-9 のプロドメインはアポトーシス中に除去されない。実際、カスパーゼ-9 (プロカスパーゼ-9 およびプロドメインを切断されたカスパーゼ-9) は、実質的触媒活性を保持するためにアポトソームに結合したままでなければならない(44)。いくつかの研究は、この CARD-CARD 相互作用が、活性化に必要な単量体カスパーゼ-9 の立体変化を誘導し得ることを示唆しているが(45)、一方では代わりにアポトソームが、プロカスパーゼ-9 の局所的な濃度を増加させ、二量体活性化を促進すると考えられている(46)。

カスパーゼ-9 と他のイニシエーターカスパーゼ (ならびにエフェクターカスパーゼ) との間の別の顕著な相違点は、大サブユニットおよび小サブユニットを接続するリンカーの長さである。ほとんどのカスパーゼにおいて、リンカーは活性部位形成に必要な構造変化を可能にするために切断されなければならない。しかしながら、カスパーゼ-9 では、リンカーが特に長く、アポトソーム内で二量体化の際に、リンカーは移動し、切断のない状態で活性部位へのアクセスを可能にすると予測されている。プロカスパーゼ-9 は、アポトソームに結合すると高い触媒活性を有すると考えられる(47)。最近の研究は、プロカスパーゼ-9 がプロテアーゼの切断型と比較してアポトーシスに対してより高い親和性を有し、それによりプロカスパーゼ-9 の動員および活性化、プロセッシングおよび複合体からの放出の連続サイクルを促進することを示唆している。

1-2-4. エフェクターカスパーゼ

1-2-4-1. カスパーゼ-3

カスパーゼ-3はおそらく、特異性およびアポトーシスにおける役割に関して、カスパーゼの中で最もよく理解されている。カスパーゼ-3はアポトーシス時に切断される核酵素ポリ(ADP リボース) ポリメラーゼ (PARP) のような多くの重要なタンパク質の分解切断の一部または全部を担うアポトーシスの主要な酵素の1つである。発現された配列タグデータベースを検索するためにカスパーゼ-1 および CED-3 の活性部位をコードする DNA 配列を用いて、ヒト配列を同定、クローニングし、CPP32 と呼ばれる 32kDa のシステインプロテアーゼをコードすることが示された(50)。カスパーゼ-3は、リンパ球由来の細胞株において高発現を示し、免疫系における重要であることが示唆された (50)。

カスパーゼ-3の基質である PARP の既知の開裂部位 (DEVD↓G) に基づいて、モデル基質として Ac-DEVD-AMC を合成し、PARP 開裂の特異的阻害剤として、および精製のための親和性リガンドとして Ac-DEVD-CHO およびそのビオチン化誘導体が合成された。エレクトロスプレーMS および N 末端配列分析を用いて、活性酵素は、Asp28-Ser29 間および Asp175-Ser176 間での切断によって、前駆体タンパク質に由来する 17kDa および 12kDa の2つのサブユニットからなることが示された(図 9) (21)。最初の切断はおそらく大サブユニットと小サブユニット間の Asp175 であるが、切断によるプロドメインの除去は自己切断によるものと考えられる(51)。

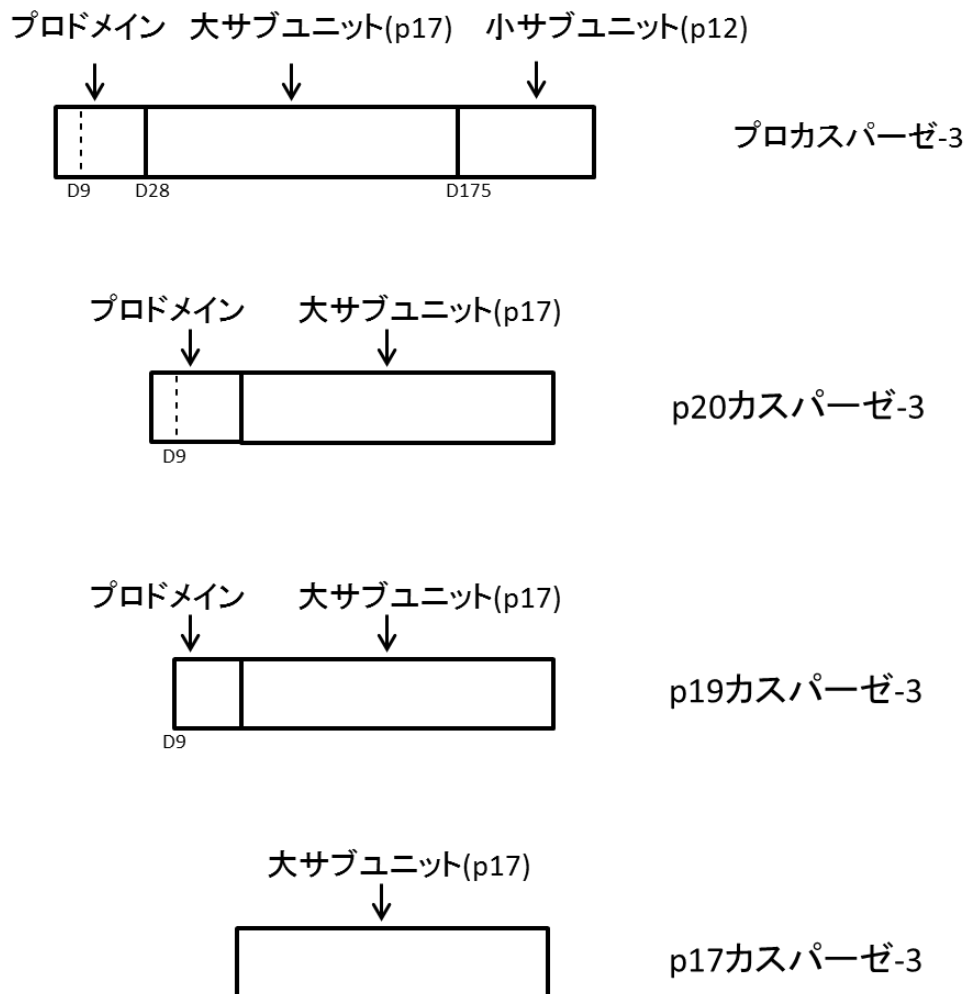


図9 プロカスパーゼ-3 と切断を受けたカスパーゼ-3 の構造

カスパーゼ-3 はプロドメイン、大サブユニット(p17)、小サブユニット(p12)から構成されている。刺激によって Asp175 の C 末端側が切断を受け p20 カスパーゼ-3 と小サブユニット(p12)が生成される。次いで、Asp9 または Asp28 の C 末端側が切断され、それぞれ p19、p17 カスパーゼ-3 が生成される。

カスパーゼ-3 の基質である Inhibitor of Caspase-activated DNase (ICAD) はアポトーシスのヌクレオソーム間の DNA 断片化が進行する前に切断される。ICAD は、アポトーシス DNA 断片化を促進する CAD と呼ばれる 40kDa のエンドヌクレアーゼを有する複合体として存在する(52)。ICAD は、CAD の特異的インヒビターとしても、エンドヌクレアーゼの適切なフォールディングを確実にする分子シャペロンとしても機能する (53)。CAD は ICAD と結合している間は抑制されている。しかし、カスパーゼ-3 は ICAD を切断し、CAD の抑制状態から活性化へと誘導し、DNA が分解される(52, 53)。

カスパーゼ-3 の基質となるタンパク質は、DNA-dependent protein kinase catalytic subunit(DNA-PKcs) (54)、Replication factor C(RFC) (55)、Topoisomerase (56)、Histone (57)、U1-70K (58)、Mdm2 (59)、Gelsolin(60)、Actin(61)、Fodrin(62)があり、アポトーシスの誘導に係わっていることが示唆されている。そしてカスパーゼ-3 は特にカスパーゼの中でも研究が進んでいる。

1-2-4-2. カスパーゼ-7

カスパーゼ-7はカスパーゼ-3と高い類似性を有する303アミノ酸のタンパク質である(図10)。エフェクターカスパーゼとして分類されるカスパーゼ-7は、プロドメイン、大サブユニット(p20)、小サブユニット(p10)、サブユニットを連結しているリンカーより構成され発現している。カスパーゼ-7の活性化は、Asp23が切断されプロドメインが除去される。次いでAsp198およびAsp206のリンカーの切断によって大サブユニットと小サブユニットが生成され活性化型のヘテロ四量体が形成され则认为られている(22)。

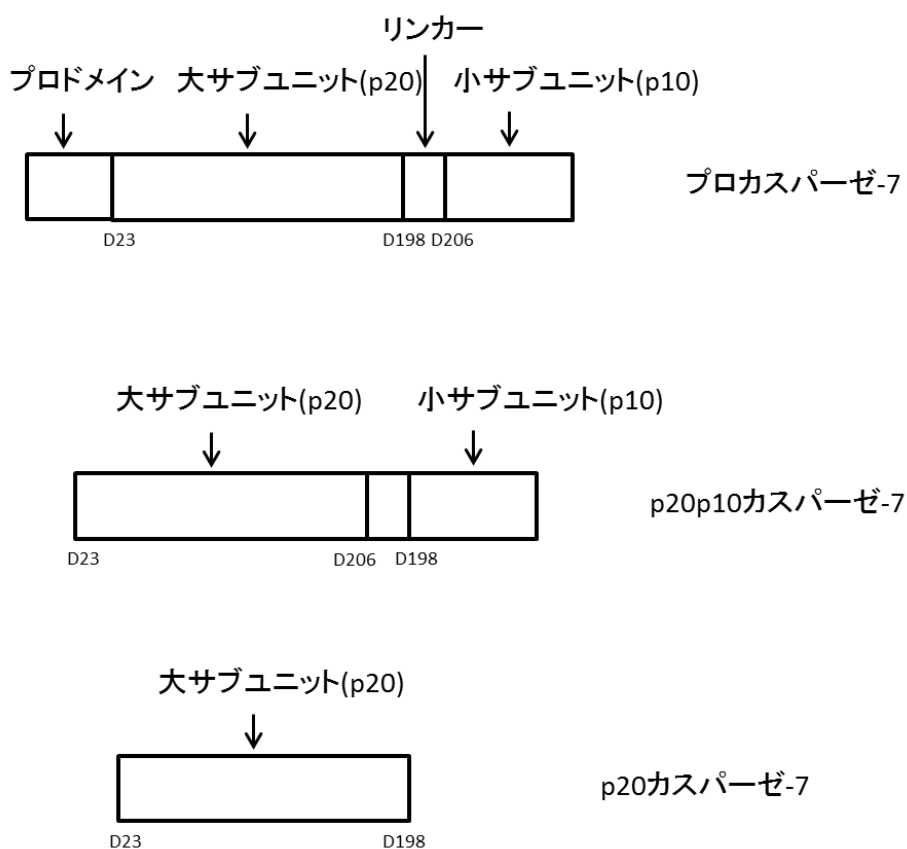


図10 プロカスパーゼ-7と切断を受けたカスパーゼ-7の構造

カスパーゼ-7はプロドメイン、大サブユニット(p20)、小サブユニット(p10)、サブユニットを連結させるリンカーから構成されている。刺激によってAsp23のC末端側が切断されカスパーゼ-7(p20p10カスパーゼ-7と呼ぶことにする)生成される。Asp198とAsp206のC末端側が切断され、大サブユニット(p20)と小サブユニット(p10)が生成される。

カスパーゼ-3とカスパーゼ-7の違いについての検討もされている。内因性のアポトーシ

ス誘導時にカスパーゼ-3 が効率的にアポトーシスを誘導したが、カスパーゼ-7 は必ずしも必要がないことが明らかになっている(22, 63)。カスパーゼ-7 の機能は細胞の剥離と活性酸素種(ROS)の産生に作用していることが分かった。接着性の細胞は足場から剥離するとアノイキス(anoikis)と呼ばれるアポトーシスが誘導される。ROS もアポトーシスを誘導することが示唆されているが過剰な産生はネクロティックな細胞死を誘導することが知られている。反対にカスパーゼ-3 は ROS 産生の抑制に働いていることが示唆された(63)。

マウスを用いたノックアウト実験において、カスパーゼ-3/7 ダブルノックアウトマウスは、出生後すぐに死亡するが単独でのノックアウトでは寿命は正常であった。しかし、カスパーゼ-3 ノックアウトマウスは白内障となったが、カスパーゼ-7 ノックアウトマウスは正常であった。よって、カスパーゼ-7 はカスパーゼ-3 より選択的であることが示唆された。しかし、PARP1 やコシャペロン p21 はカスパーゼ-3 よりもカスパーゼ-7 に強く切断を受けることが報告された(64)。

カスパーゼ-7 はアポトーシスの誘導に係わるエフェクターカスパーゼと論じたが、一方で炎症に係わっているとの報告もあり、炎症時におけるカスパーゼ-7 の活性化にはカスパーゼ-1 の活性化が必要であり、カスパーゼ-3 の活性化にはカスパーゼ-1 は必要がないことが示唆された(22)。

1-2-4-3. カスパーゼ-6

カスパーゼ-6 もカスパーゼ-3, -7 同様、エフェクターカスパーゼに分類されており、プロドメイン、大サブユニット(p20)、小サブユニット(p10)、サブユニットを連結しているリンカーより構成され発現している。カスパーゼ-6 の活性化は、Asp23 が切断されプロドメインが除去される。次いで Asp179 および Asp193 のリンカーの切断によって大サブユニットと小サブユニットが生成され活性化型のヘテロ四量体が形成され则认为されている(図 11)(22)。カスパーゼ-6 の活性化はカスパーゼ-3 によって行われるとの報告がある(65)。実際、カスパーゼ-6 の Asp179 の配列(DVVD)はカスパーゼ-3 が認識する配列である(66)。しかしながら、カスパーゼ-3 活性の非存在下、カスパーゼ-3 欠損細胞でもカスパーゼ-6 は活性化でき、カスパーゼ-6 が活性化したのちにカスパーゼ-3 が活性化する経路も報告されている(67, 68, 69)。

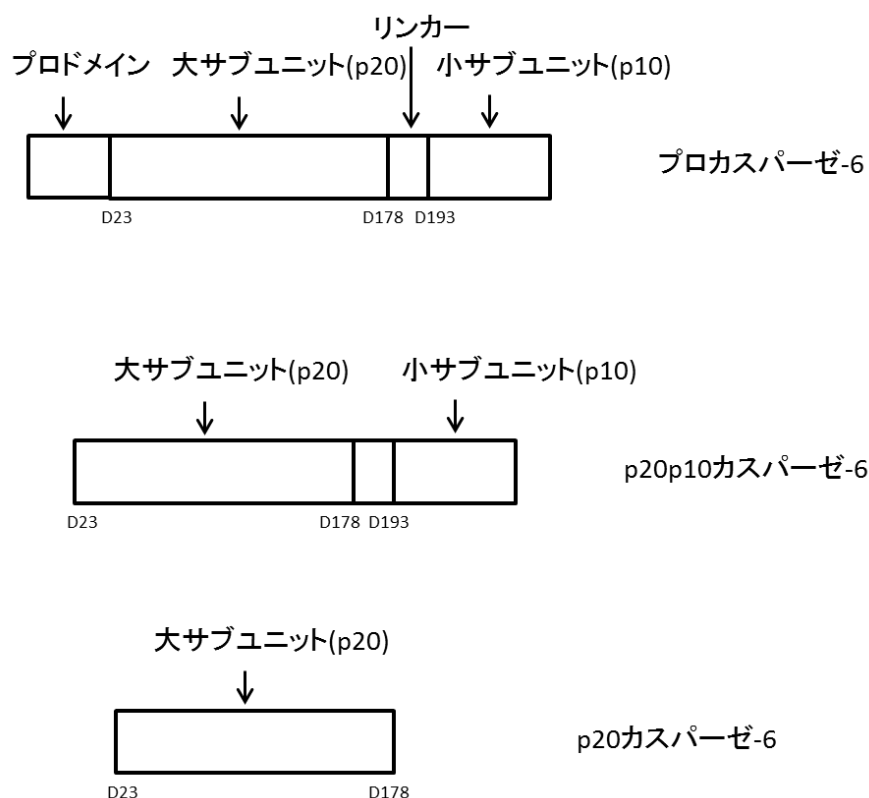


図 11 プロカスパーゼ-6 と切断を受けたカスパーゼ-6 の構造

カスパーゼ-6 はプロドメイン、大サブユニット(p20)、小サブユニット(p10)、サブユニットを連結させるリンカーから構成されている。刺激によって Asp23 の C 末端側が切断されカスパーゼ-6 (p20p10 カスパーゼ-6 と呼ぶことにする) 生成される。Asp179 と Asp193 の C 末端側が切断され、大サブユニット(p20)と小サブユニット(p10)が生成される。

カスパーゼ-6は核の構成タンパク質である NuMA とラミンを切断することによってアポトーシスを誘導していると考えられている(70, 71)。さらに転写因子である special AT-rich sequence binding protein 1(STAT1) (72)、cAMP response element binding protein(CBP) (73)やオートファジー関連因子の Beclin1 (74)も切断しているらしい。

カスパーゼ-6に対する研究はカスパーゼ-3, -7に比べ進んでいないが神経変性疾患においてよく研究されている。カスパーゼ-6は神経変性疾患のハンチントン病やアルツハイマー病において活性化していることが分かり、ハンチントン病に係わるタンパク質のハンチンチン(75)、アルツハイマー病に係わるタンパク質 App(76)、プレセニリン(77)、タウ(78)も基質としていることが分かった。しかしながら、ハンチントン病、アルツハイマー病において観察される細胞死がアポトーシスであるかどうかは不明である。だがアポトーシスにおいて重要なタンパク質の p53 がハンチントン病におけるカスパーゼ-6の活性化に係わっていることが示唆された(79)。

1.3. Bcl-2 ファミリー

1976年に最初の癌遺伝子である *c-src*(80)が発見されて以来、種々の癌遺伝子が発見されてきた。特に1985年に Tsujimoto らによって発見された B-cell lymphoma 2(Bcl-2)遺伝子はアポトーシス研究に対し発展に大きく寄与した(81)。Bcl-2の機能はほかの癌遺伝子と同様に細胞増殖に関与していると予想されていたが1988年に、Vaux らはインターロイキン(IL)-3依存性細胞のIL-3非存在下でBcl-2が生存に寄与することを示した(82)。1989年にはTsujimotoによってBcl-2がアポトーシスの誘導を抑制すること明らかにした(83)。さらにBcl-2に類似のタンパク質が20以上発見されファミリーを形成していることが分かった(84)。Bcl-2ファミリータンパク質は機能と構造によって3つのグループに分類されている(図12)。

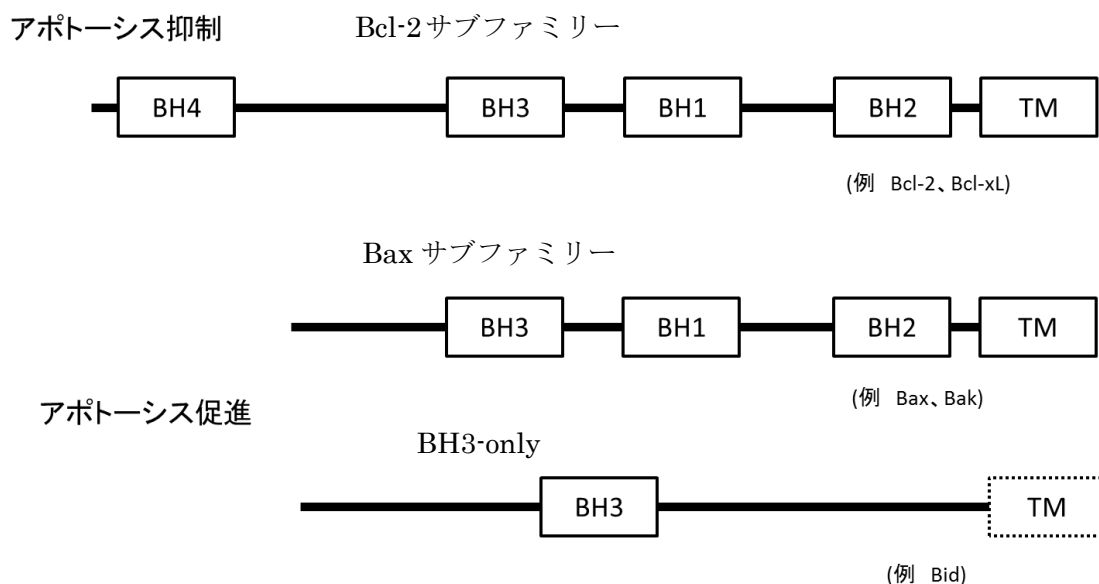


図12 Bcl-2 ファミリーの構造

アポトーシス抑制 Bcl-2 ファミリータンパク質は全てのドメインを有し、アポトーシス促進 Bcl-2 ファミリータンパク質は BH3 を含んだ BH4 以外のどれかのドメインを有している。

Bcl-2 ファミリータンパク質は、4つの Bcl-2 相同性 (BH) ドメイン (BH1、BH2、BH3 または BH4) の少なくとも1つのドメインと膜貫通ドメイン (TM) を有する。アポトーシス抑制 Bcl-2 ファミリーメンバーは、4つの BH ドメインのすべてを含む。アポトーシス促進 Bcl-2 ファミリーメンバーは、マルチドメインまたは BH3 のみのタンパク質 (BH3-only) に分けることができる。一部の BH3-only タンパク質は (transmembrane) (TM) を持

っていないものも存在する(84)。

BH3-only タンパク質は Bcl-2 サブファミリーや Bcl-2-associated X protein (Bax)サブファミリーの上流に位置しそれぞれをネガティブ、ポジティブに制御している。Bax サブファミリーはミトコンドリア膜透過性亢進に必須と考えられている。Bcl-2 サブファミリーは Bax サブファミリーや BH3-only タンパク質と相互作用し抑制していると考えられている(85)。

Bcl-2 ファミリータンパク質の相互作用には BH1, BH2, BH3 が必要である。BH1 と BH2 が BH3-only タンパク質と結合する。BH4 ドメインはアポトーシスの抑制に必須であることが BH4 ドメイン欠損 Bcl-2/Bcl-xL によって証明されている。さらに BH3 はアポトーシス誘導に必須である(85, 86)。

Bax は通常、サイトゾルに単量体の不活性化型として存在しており、アポトーシス刺激によってミトコンドリアに局在移行し多量体化し、活性を持つ。Bcl-2/Bcl-xL はミトコンドリアに通常時から局在しミトコンドリアの膜透過性を抑制している。アポトーシス性の刺激によって Bax や BCL-2-antagonist/killer-1(Bak)および BH3-only タンパク質と相互作用のバランスが崩れると膜透過性が亢進しアポトーシス性タンパク質がミトコンドリアからサイトゾルに放出されアポトーシスが進行すると考えられている(87, 88)。

外因性経路において BH3-only タンパク質の Bid が内因性経路をつなぐ分子であることが分かってきた。カスパーゼ-8 は活性化する下流のエフェクターカスパーゼを活性化させアポトーシスを誘導するが、Bid に対しても作用する。活性化カスパーゼ-8 は Bid の C 末端側を切断する。切断された Bid は truncated Bid(tBid)と呼ばれミトコンドリアに移行する。移行後は上述したように Bcl-2 ファミリーと相互作用し、膜透過性の亢進及びシトクロム c 等の放出、カスパーゼ-9 の活性に次いでエフェクターカスパーゼが活性化、アポトーシスが進行する(89)。

1.4. 7A6 抗原

アポトーシスにおいて、様々なタンパク質がアポトーシスを調整している。そこで Zhang らは新たなアポトーシス調節タンパク質を同定するために、 $1\text{-}\beta\text{-D-Arabinofuranosylcytosine(Ara-C)}$ によってアポトーシスを誘導した白血病 T 細胞株 Jurkat をマウスに対して免疫源として新たなモノクローナル抗体を作製した(90)。ここでは抗体を Apo2.7、および抗原を 7A6 抗原 (7A6) と呼ぶことにする。

7A6 はアポトーシス時に Jurkat 細胞において、ミトコンドリアに局在することが電子顕微鏡で確認され、7A6 の分子量はウェスタンブロット法によって 38 kDa と推定された(90)。また、通常はサイトゾル中に局在しているがアポトーシス時にミトコンドリアに局在移行していることが示唆された(92)。7A6 の発現に関しては、T 細胞株の Molt-4、CEM と HUT-102、B 細胞株の Daudi、Ramos、と Raji、組織球性細胞株の U937、前骨髄球細胞株の HL-60 でも確認されている。よって 7A6 のミトコンドリア局在はあらゆる細胞種のアポトーシスの共通のイベントと認識されている(90, 91)。

Apo2.7 は主に、蛍光色素を結合させフローサイトメトリー(FCM)によってアポトーシスを検出するために用いられている(91, 92, 93)。7A6 はアポトーシス時にミトコンドリアに局在するが(図 13)、DNA の断片化やクロマチンの凝縮より前の段階で起こることも確認されている(90)。

7A6 のシグナル経路の解析では、抗 Fas 抗体によるデスレセプター誘導アポトーシスとミトコンドリア傷害性のフィンゴリモド(FTY720)によってカスパーゼ依存性の解析が行われている。Jurkat 細胞に対して抗 Fas 抗体及び FTY720 を作用させるとカスパーゼの活性と共にミトコンドリアの膜電位低下、DNA 断片化が確認され、7A6 のミトコンドリア局在も確認された。さらに汎カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk 及びカスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DEVD-CHO の作用により 7A6 のミトコンドリア局在の減少が確認された(92)。よって、7A6 のミトコンドリア局在はカスパーゼ-3 によって制御されていることが示唆された。しかしながら、カスパーゼ-3 が認識する基質タンパク質の配列 DXXD(X は任意のアミノ酸)に基づいたものであり、カスパーゼ-3 の阻害能および特異性があまり高くないことがわかっている(94,95)。つまり、7A6 を制御しているカスパーゼはカスパーゼ-3 とは結論付けられず、7A6 とカスパーゼとの関係性は依然不明なままである。したがって、どのカスパーゼが 7A6 に影響を及ぼすのか明らかにすることを目的とした。

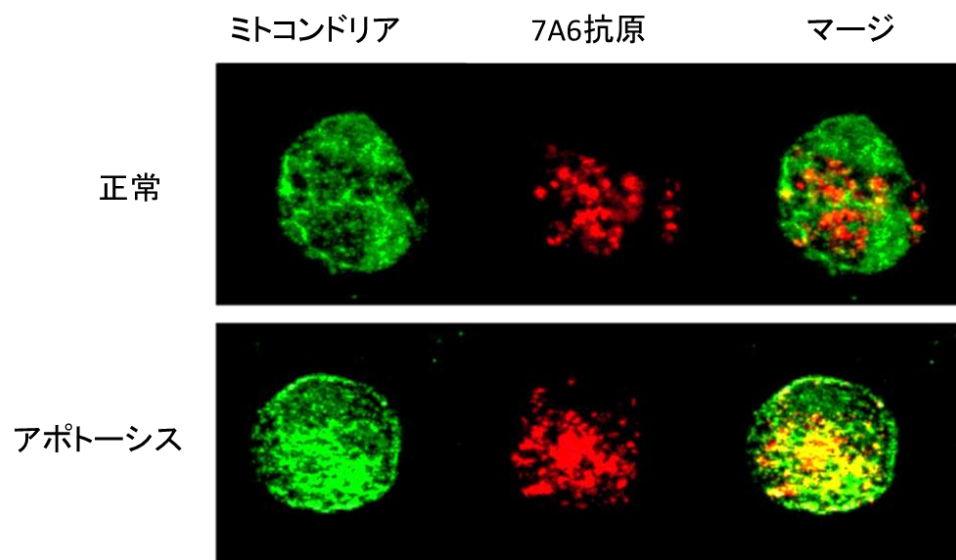


図 13 アポトーシス時にミトコンドリアに局在する 7A6 の共焦点顕微鏡図

細胞を固定後、ジギトニン処理をし、7A6 を Apo2.7-PC5 で赤色に染色した Jurkat 細胞を共焦点顕微鏡で観察した。緑色はミトコンドリアを示している。黄色はミトコンドリアに 7A6 が局在していることを示している。

第2章 Fas によるカスパーゼ依存アポトーシスの誘導と 7A6 抗原のミトコンドリア局在移行

2-1. 背景

能動的な細胞死であるアポトーシスは、様々なタンパク質が関与し進行する。しかしアポトーシスを調節しているタンパク質や、アポトーシスの誘導機構は完全には解明されていない。そこで Zhang らは新たなアポトーシスに関連するタンパク質を探索するために、アポトーシスを誘導した Jurkat 細胞を免疫源として作製したモノクローナル抗体 Apo2.7 を用いて抗原となったタンパク質 7A6 抗原がアポトーシス時にミトコンドリアに局在することを見出した(90)。だが、7A6 の構造や機能はいまだわかっていない。7A6 のシグナル経路の解析では、Jurkat 細胞に対して抗 Fas 抗体及び FTY720 を作用させるとカスパーゼ依存的にアポトーシスが誘導され、7A6 のミトコンドリア局在も確認された。さらに汎カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk 及びカスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DEVD-CHO の作用により 7A6 のミトコンドリア局在の減少が確認された(92)。よって 7A6 はカスパーゼ-3 に制御されていることが示唆された。しかしながら Ac-DEVD-CHO は基質特異性が低いことが分かっており、カスパーゼ-3 だけでなくカスパーゼ-7 やカスパーゼ-6 も阻害してしまう(図 14)(94, 95)。したがって 7A6 のミトコンドリア局在にはカスパーゼ-3 だけでなくエフェクターカスパーゼである、カスパーゼ-3, -6, -7 が関与することが否定できない。カスパーゼはアポトーシスにおいて特に重要な因子として認識されているため、7A6 とカスパーゼの関連性を検討することによって 7A6 の更なる理解が進むと考えている。

そこで、7A6 とカスパーゼの解析のために、アポトーシスの誘導シグナルとしてよく用いられる抗 Fas 抗体を用いることにした。Fas からイニシエーターカスパーゼのカスパーゼ-8 が活性化すると下流に位置するエフェクターカスパーゼ（カスパーゼ-3, -6, -7）が活性化し、アポトーシスが実行される。さらにカスパーゼ-8 は Bcl-2 ファミリータンパク質の一つの Bid を切断する。切断された Bid は tBid と呼ばれ、サイトゾルからミトコンドリア膜上に局在移行する。移行した tBid はアポトーシス進行型の Bak や Bax と相互作用し MPT を亢進、アポトーシスを進行に導くと同時に、アポトーシス抑制型の Bcl-2 や Bcl-xL と相互作用および抑制すると考えられている(89)。作用後はミトコンドリアから放出されたシトクロム c や Smac/DIABLO の作用によってイニシエーターカスパーゼのカスパーゼ-9 が活性化し、下流のエフェクターカスパーゼ（カスパーゼ-3, -7, -6）が活性化しアポトーシスが進行する(42)。さらにカスパーゼ-3, -6 はカスパーゼ-8 や Bid にも作用しアポトーシスシグナルが増幅することも確認されている(図 15)(96, 97)。

阻害剤	カスパーゼ-1	カスパーゼ-2	カスパーゼ-3	カスパーゼ-4	カスパーゼ-5
Ac-DEVD-CHO	18	1710	0.23	132	205

阻害剤	カスパーゼ-6	カスパーゼ-7	カスパーゼ-8	カスパーゼ-9	カスパーゼ-10
Ac-DEVD-CHO	31	1.6	0.92	60	12

濃度単位：nM

図 14 カスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DEVD-CHO のカスパーゼ阻害特性(IC₅₀ から計算した解離定数の濃度)

Ac-DEVD-CHO は低濃度でカスパーゼ-3 を阻害するが、表より、カスパーゼ-1, -6, -7, 8, -9, -10 も低濃度で阻害することが示され、特異性が高くないことが分かっている(94)。

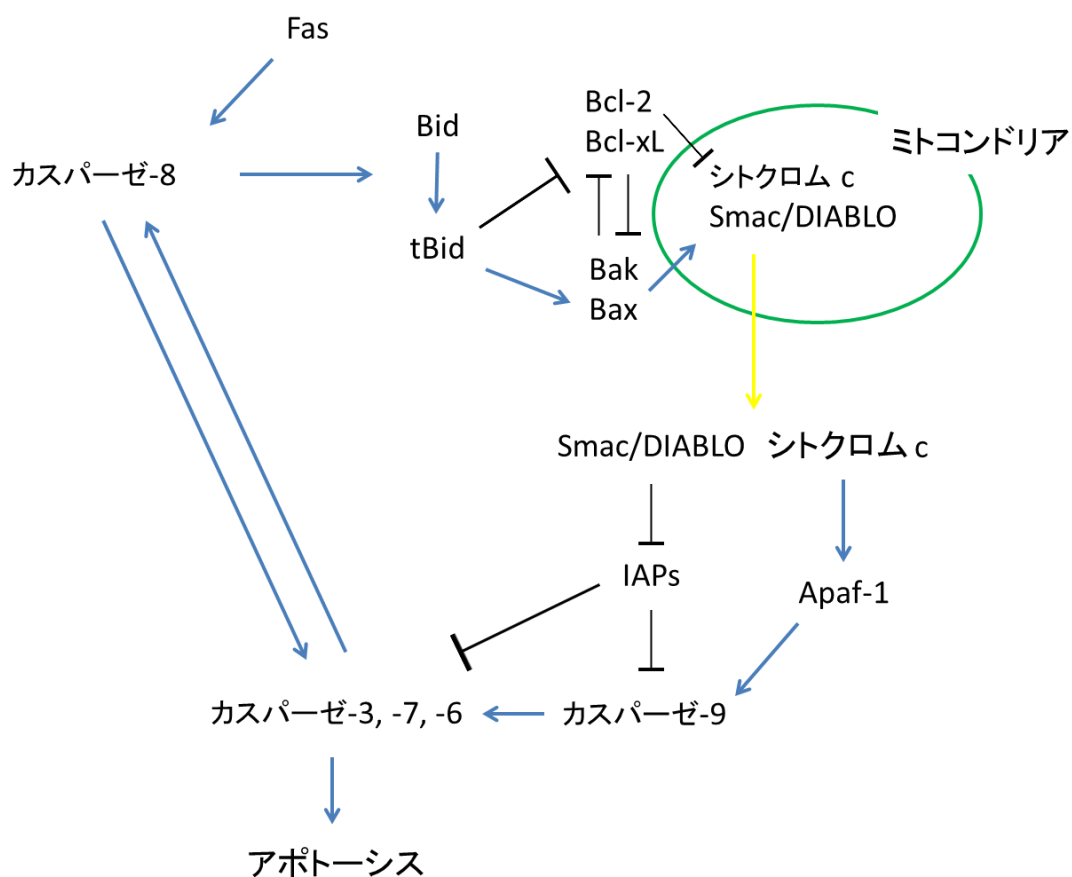


図 15 Fas 誘導アポトーシスの経路図

Fas に刺激が加わるとカスパーゼ-8 が活性化し、下流に刺激が伝わりアポトーシスが進行していく。

Fas 誘導アポトーシスのカスパーゼ経路はよく研究されているため、7A6 とカスパーゼ

の関連を検討するのに適していると考えた。したがって、Jurkat 細胞をカスパーゼ阻害剤で処理し、抗 Fas 抗体によってアポトーシス刺激を加え、7A6 を解析し 7A6 とカスパーゼの関連を検討した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 細胞培養

Jurkat 細胞の培養には RPMI1640 培地(RPMI1640(Wako) 10 g/L、5 mM HCl、50 μ M 2-メルカプトエタノール、75 mg/L カナマイシン硫酸塩、24 mM 炭酸水素ナトリウム)を用い FBS を 10%になるように添加し、0.22 μ m フィルターを通して滅菌したものを用いた。また培養条件は、インキュベーター内で CO₂ 濃度 5%、37°C で培養を行った。

2-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法

直径 60 mm 細胞培養ディッシュ(Corning)を用い、RPMI1640 培地 5 mL 中に 2×10^6 cells/dish となるように播種し、カスパーゼ阻害剤 benzyloxycarbonyl-Asp-2,6-dichlorobezoyloxymethylketone (z-Asp-CH₂-DCB) (ペプチド研)を 50 μ M で 1h 作用させた後、抗 Fas 抗体(Bio Legend)を 0.5 μ g/mL になるように作用させた。カスパーゼ阻害剤及び抗 Fas 抗体の作用は CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 37°C で作用させた。

2-2-3. ウェスタンブロット法

2-2-2. で示した方法でカスパーゼ阻害剤と抗 Fas 抗体を細胞に作用させた。作用終了後 5 min、4°C、300 g で遠心後上清を除去し、リン酸生理緩衝液(PBS)で洗浄し、5 min、4°C、300 g で遠心洗浄を行い、可溶化液 (1% protease inhibitor cocktail (Sigma)、50 mM HEPES(pH 7.5)、150 mM NaCl、10 % グリセリン、1 % Triton-X、1.5 mM MgCl₂、1 mM EGTA、1 mM sodium orthovanadate) で可溶化を行った。細胞は 20 min 氷上に静置し、15 min、4°C、10,800 g で遠心を行い上清をタンパク質サンプルとして回収した。サンプルはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離した。SDS-PAGE には分離用ゲルとして 15%アクリルアミドゲルを用い、濃縮用ゲルは 4%を用いた。サンプルはそれぞれ 20 μ g/well となるように調整し、sample application buffer (10% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl(pH6.8), 20% glycerol, bromophenol blue)をサンプルと等量を加えたのち、100°C、3 min 加熱した。各 well には 20 μ L のサンプルを加え泳動を行った。条件は、50 V、20 min から 100 V、90 min

を行った。泳動後のゲルは親水処理を施したポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜へタンパク質を転写した。親水処理はメタノールに 20 s, 超純水に 3 min, ブロットティングバッファー(48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 1.3 mM SDS, 20% methanol)に 3 min 順次浸していった。転写後、ブロッキング液(3% skimmed milk)を 1 h 作用させ、1:1000 の割合で希釈した一次抗体液カスパーゼ-3、(Santa cruz)、カスパーゼ-7、カスパーゼ-6、 β -アクチン(Cell Signaling Technology)を作用させた。二次抗体 rabbit IgG- Horseradish peroxidase (HRP) (Cell Signaling Technology)を 1:2000 の割合で希釈し作用させ、PBS で 5 回洗浄した。洗浄終了後、Pierce ECL Western Blotting Substrate を 1 min 作用させ、ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare)によってタンパク質を検出した。

2-2-4. アガロース電気泳動による DNA 断片化の検出

薬剤処理後の細胞に Buffer A(10 mM Tris-HCl (pH7.8), 3 mM MgCl₂, 2 mM 2ME)を 0.5 ml 加え、懸濁して遠心洗浄し、上清除去後、50 μ L の Lysis buffer(50 mM Tris-HCl (pH7.8), 10 mM EDTA 2Na, 0.5 % sodium lauryl sarcocinate (SLS) 1 mg/ml Proteinase K)を加え、ピペッティングでよく混合した。ブロックインキュベーターで 30 min, 50°Cでインキュベートした。インキュベート後、4 μ L の 5 mg/ml RNase A を加え、ピペッティングでよく混合し 15 min, 50°Cでインキュベートした。30 μ L の Application buffer(0.025% bromophenol blue、20% グリセリン、0.09 M Tris(hydroxymethyl)aminomethane、0.0025 M EDTA \cdot 2Na、0.09 M boric acid)を加え、ピペッティングでよく混合し 20 μ L を 1.8%アガロースゲルで電気泳動した。

2-2-5. フローサイトメトリーによる 7A6 の検出

細胞は抗 Fas 抗体の作用終了後、5 min、4°C、300 *g* で遠心後上清を除去し、PBS によって、5 min、4°C、300 *g* で遠心洗浄を行い上清を除去後、20 μ g/mL digitonin-5% BSA-PBS で 20 min 氷冷し、5 min、4°C、300 *g* で遠心後、上清を除去した。0.5% BSA-PBS で Apo2.7-PC5 を 1:100 で希釈し、37°Cで 1 h 作用させた。作用後、PBS で 3 回洗浄し、フローサイトメーターである FACS Calibur (Becton Dickinson)で PC5 の蛍光強度を測定することにより 7A6 を定量した。

2-2-6. 共焦点顕微鏡による 7A6 の検出

細胞には 100 nM Mitotracker green を 1 h, CO₂濃度 5%のインキュベーター内で 37°Cで作させた。作用後 2-2-2.で示した方法でカスパーゼ阻害剤と抗 Fas 抗体を作用させた。細

胞は抗 Fas 抗体の作用終了後、5 min、4℃、300 *g* で遠心後、上清を除去し、PBS によって、5min、4℃、300 *g* で遠心洗浄を行い上清を除去後、20 µg/mL digitonin-5% BSA-PBS で 20 min 氷冷し、5 min、4℃、300 *g* で遠心後、上清を除去した。0.5% BSA-PBS で Apo2.7-PC5 を 1:100 で希釈し、37℃で 1 h 作用させた。作用後、PBS で 3 回洗浄し、共焦点顕微鏡である FV10 (Olympus)を用いて観察を行った。

2-2-7 統計解析

2 群間の比較のためにスチューデント *t* 検定を用いて有意差の検定を行い、検定の結果が $p < 0.05$ であるとき、統計的に有意であるとみなした。

2-3. 結果

2-3-1. ウェスタンブロット法による抗 Fas 抗体と汎カスパーゼ阻害剤 z-Asp-CH₂-DCB の作用

抗 Fas 抗体を作用させるとカスパーゼ-8 は切断をされ活性化し (図 15)、カスパーゼ依存的にアポトーシスを誘導する。ウェスタンブロットの結果より (図 16)、カスパーゼ-8 の p43/p41 の生成がカスパーゼ-8 活性化が進行していることを示し、p30 も活性化が進んでいることを示している。しかし、汎カスパーゼ阻害剤 z-Asp-CH₂-DCB を作用させておくと、バンドが薄くなっている (検出量の減少)。カスパーゼ-3 では、抗 Fas 抗体作用によって p20, p19, p17 のバンドが検出された。z-Asp-CH₂-DCB 未処理では p20 の検出量は少なく p17 が検出されている。しかし z-Asp-CH₂-DCB 作用時では、p20 の検出量が多く、p17 は検出できていない (図 17)。よって抗 Fas 抗体はカスパーゼ-8, -3 を活性化し、z-Asp-CH₂-DCB 処理時ではカスパーゼは活性化が阻害された。さらに、カスパーゼ-3 では z-Asp-CH₂-DCB によって p20 の生成量が増加し、p17 の生成が阻害された。以上の結果より、z-Asp-CH₂-DCB 処理時では、不活性化型の p20 カスパーゼから活性化型の p17 カスパーゼ-3 への切断生成が阻害された。

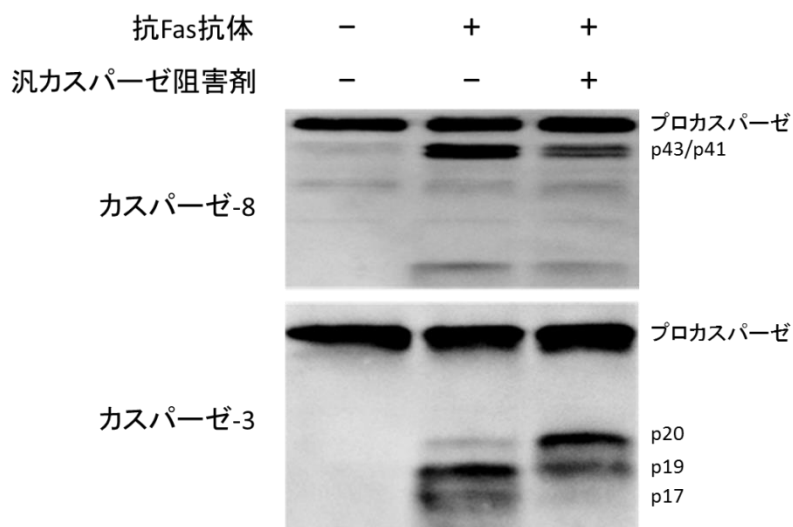


図 16 抗 Fas 抗体と汎カスパーゼ阻害剤 z-Asp-CH₂-DCB の作用

Jurkat 細胞に z-Asp-CH₂-DCB を 50 μM で 1 時間処理し、抗 Fas 抗体を 0.5 μg/mL で 4 時間作用させた後、細胞を可溶化した。z-Asp-CH₂-DCB および抗 Fas 抗体の未作用サンプルも作成し、ウェスタンブロット法によってカスパーゼの開裂状態を解析した。

2-3-2. アガロース電気泳動による DNA ラダーの検出

Fas 誘導アポトーシスはカスパーゼを活性化させ DNA ラダーを生成しアポトーシスを誘導することが知られている。よって DNA ラダーの検出はアポトーシスの指標として用いられている。ウェスタンブロットでは抗 Fas 抗体によってカスパーゼの開裂(活性化)と z-Asp-CH₂-DCB によってカスパーゼの活性化が阻害されることを確認した。さらにアガロース電気泳動によって DNA ラダーも検出し、z-Asp-CH₂-DCB によって DNA ラダーの生成が阻害されることも確認した(図 17)。よって本実験に用いた抗 Fas 抗体も Jurkat 細胞にイニシエーターカスパーゼのカスパーゼ-8 を活性化させ、エフェクターカスパーゼのカスパーゼ-3 を活性化させ、z-Asp-CH₂-DCB によってカスパーゼの活性が阻害されることが示唆された。

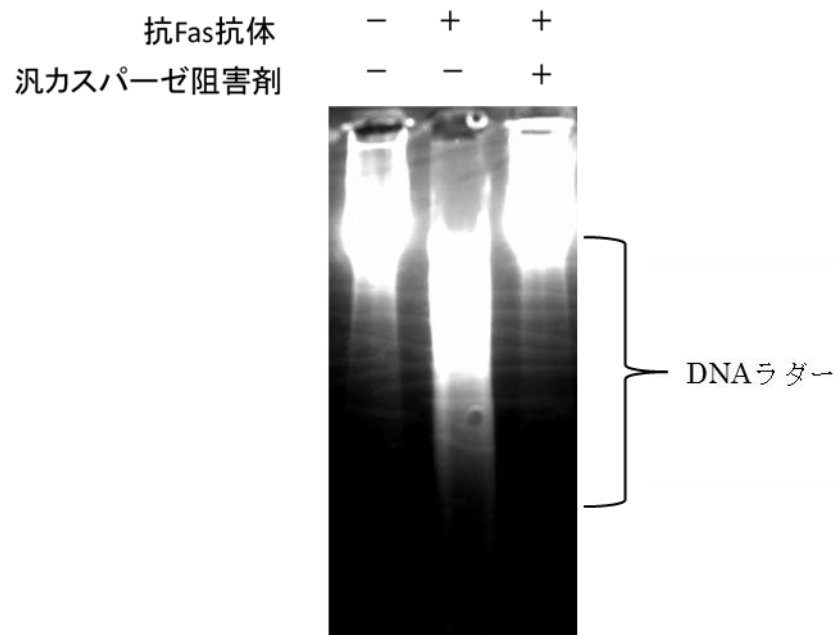


図 17 DNA ラダーの検出

Jurkat 細胞に $z\text{-Asp-CH}_2\text{-DCB}$ を $50\text{ }\mu\text{M}$ で 1 時間処理し、抗 Fas 抗体を $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ で 6 時間作用させた後、細胞を可溶化した。 $z\text{-Asp-CH}_2\text{-DCB}$ および抗 Fas 抗体の未作用サンプルも作成し、アガロース電気泳動によって DNA ラダーを検出した。

2-3-3. 共焦点顕微鏡による 7A6 抗原の検出

7A6 抗原は電子顕微鏡によりアポトーシス誘導に伴いミトコンドリアに局在することが確認されている。Fas 誘導アポトーシス時にミトコンドリア局在を確認するために共焦点顕微鏡を用いて確認した(図 18)。緑は *mitotracker green* で蛍光染色したミトコンドリアであり、赤は Apo2.7 に結合させた蛍光色素 PC-5 であり、赤く蛍光している場所に 7A6 が存在している。抗 Fas 抗体を作用させアポトーシスを誘導した Jurkat 細胞は緑と赤の蛍光が重なり黄の蛍光が表れている。つまりミトコンドリアと 7A6 が同じ場所、共局在していることを示している。

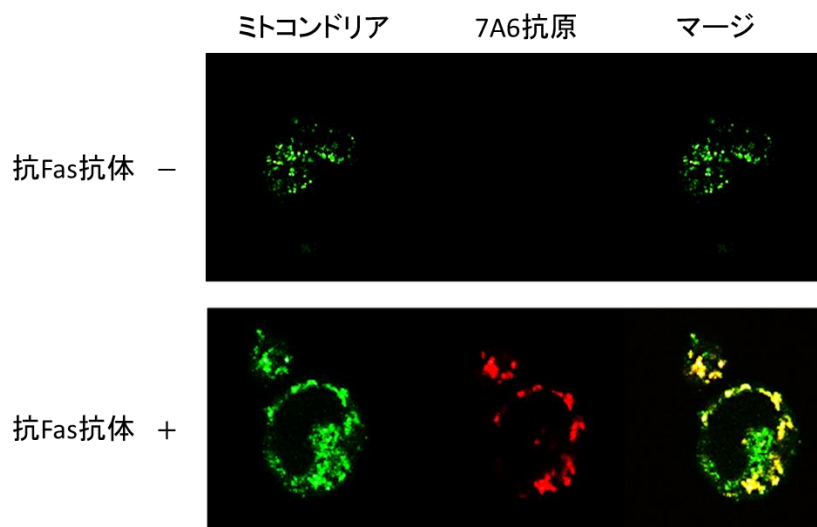


図 18 共焦点顕微鏡によるミトコンドリアと 7A6 抗原の局在解析

抗 Fas 抗体を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6 時間処理し、mitotracker green によってミトコンドリアを緑色の蛍光に染色し、ジギトニンによって細胞膜透過性をもたせ、さらに赤色蛍光色素 PC5 を結合させた Apo2.7 を作用させた。蛍光を共焦点顕微鏡で解析した。

2-3-4. フローサイトメトリーによる 7A6 の検出

7A6 抗原のミトコンドリアを共焦点顕微鏡で確認したが、赤色蛍光の強度を測定することにより 7A6 を相対的に定量することができるため、フローサイトメトリー(FCM)を用いて強度を測定し、7A6 の相対量を求めた。7A6 の染色は共焦点顕微鏡と同じく赤色蛍光色素 PC5 を結合させた Apo2.7-PC5 を用いた。共焦点顕微鏡によって 7A6 はミトコンドリアに局在することを示したが、7A6 の局在量が多いほど結合できる Apo2.7-PC5 も多くなり蛍光も強くなる。しかしながら多くの細胞の蛍光強度を一つずつ定量することには向いていないと考えた。一方、FCM は細胞を一つずつレーザーを照射し蛍光強度を測定できる。よって 7A6 抗原の局在量を定量すると、抗 Fas 抗体作用により上昇し、z-Asp-CH₂-DCB により有意に減少した(図 19)。上記の結果より、抗 Fas 抗体は Jurkat 細胞に対しカスパーゼ依存的にアポトーシスを誘導し、7A6 のミトコンドリア局在もカスパーゼ依存的事であることが示唆された。

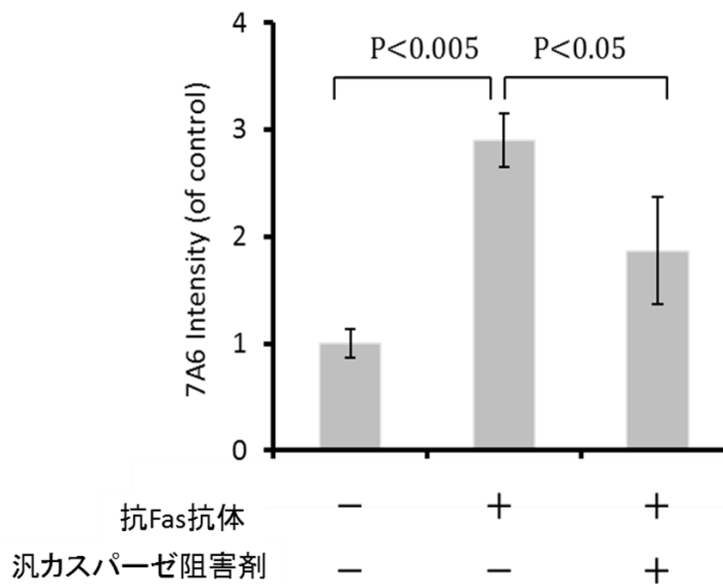


図 19 7A6 抗原の定量解析

Jurkat 細胞に $z\text{-Asp-CH}_2\text{-DCB}$ を $50\ \mu\text{M}$ で $1\ \text{h}$ 処理し、抗 Fas 抗体を $0.5\ \mu\text{g/mL}$ で $6\ \text{h}$ で処理した後、ジギトニン処理後、赤色蛍光色素 PC5 を結合させた Apo2.7 を作用させた細胞の蛍光強度を FCM で解析した。

2.4. 考察

抗 Fas 抗体を作用させると FasL と同様に Fas を三量体化させカスパーゼ-8 を活性に導く。本実験でも抗 Fas 抗体を Jurkat 細胞に作用させると切断されたカスパーゼ-8 がウェスタンブロットによって p43/p41 および p30 が検出できた。またカスパーゼ-3 も、切断を受けたカスパーゼ-3 が検出できた。カスパーゼ-3 の切断は Asp175 でまず起こり p20 と p12 が生成する。生成した p20 はさらに切断を受けプロドメインが除去される。その際の切断部位は Asp9 と Asp28 の二つあるが、通常は Asp28 が切断され p17 が生成し p12 とヘテロ四量体を形成し活性化型となると考えられている。本実験結果は Asp9 の切断生成物が多かった。汎カスパーゼ阻害剤 $z\text{-Asp-CH}_2\text{-DCB}$ を作用させるとカスパーゼ-8 は p43/p41 と p30 の検出量の減少によって切断が阻害されたことがわかる。カスパーゼ-3 は p17 への切断が阻害されているが p20 の検出量が増加した。よって、 $z\text{-Asp-CH}_2\text{-DCB}$ はプロカスパーゼ-3 から p20 カスパーゼ-3 への切断は阻害できないが、プロドメインの切断阻害を行い活性化を阻害していることが示唆された。

DNA はアポトーシスの進行に伴いラダー状に切断されていく。よってアガロース電気泳

動によって断片化した DNA を分離、検出すればアポトーシスの検出が行える。抗 Fas 抗体を作用させた Jurkat 細胞は DNA のラダー生成が検出できたが z-Asp-CH₂-DCB 作用時では抗 Fas 抗体を作用させても DNA ラダーの検出は行えなかった。DNA ラダーの生成は CAD が DNA をヌクレオソーム単位(180 bp)で切断し生成するが CAD の活性化はカスパーゼ-3 の活性化が必要である。ウェスタンブロットの結果からも、切断されたカスパーゼ-3 は活性化しており z-Asp-CH₂-DCB 作用によって、カスパーゼ-3 は阻害されアポトーシスの阻害につながったと考えられる。

Apo2.7 は蛍光色素を結合させた状態で FCM によって使用される。しかしながら FCM では 7A6 の局在は解析できない。7A6 はアポトーシス時にミトコンドリアに局在するとの報告から(90)、mitotracker green を用いてミトコンドリアを緑色にした状態で Apo2.7-PC5 によって 7A6 を赤色に蛍光染色した。結果より、マージの画像では抗 Fas 抗体を作用させた Jurkat 細胞に黄色蛍光が観察された。黄色は緑色と赤色が重なった状態であり、ミトコンドリアと 7A6 が共局在していることを示している。つまり、アポトーシス誘導に伴い 7A6 がミトコンドリアに局在することが示された。

FCM では局在場所は確認できないが蛍光強度を細胞一つずつ測定でき 7A6 の定量が蛍光強度より相対的に行える。結果より抗 Fas 抗体によって 7A6 の検出量は増加した。z-Asp-CH₂-DCB 作用時では、抗 Fas 抗体によって 7A6 の検出量は増加したが抗 Fas 抗体単独作用に比べ有意に減少していた。以上の結果より、抗 Fas 抗体は Jurkat 細胞に対しカスパーゼ-8 を活性化させ下流のカスパーゼ-3 を活性化させるとともにアポトーシスおよび 7A6 のミトコンドリア局在を誘導していた。

第3章 Fas によるカスパーゼの活性化と阻害剤による活性化阻害

3-1. 背景

抗 Fas 抗体はカスパーゼ-8 を活性化させアポトーシスを誘導する。カスパーゼは通常プロカスパーゼとして発現するが、活性化の刺激に伴い切断され活性型となる。活性化したカスパーゼはエフェクターカスパーゼ(カスパーゼ-3, -7, -6)を活性化させアポトーシスを誘導する(Type1)。活性化したカスパーゼ-8 は Bid にも作用でき、ミトコンドリア経路(カスパーゼ-9)からエフェクターカスパーゼを活性化させることができる。よって本章では、7A6 の上流に位置するカスパーゼを調べるために、特異的カスパーゼ阻害剤の阻害能を調べることを試みた。

7A6 に対してのカスパーゼ阻害実験では汎カスパーゼ阻害剤 *z*-Asp-CH₂-DCB およびカスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DEVD-CHO によって 7A6 のミトコンドリア局在量の減少が示されている。しかしながら DEVD 配列はカスパーゼ-3 が認識する基質の配列に基づいたものであり、特異性が高くないことが確認されている(94, 95)。しかしながら、田沼らによって DEVD 配列に代わる配列を、*in silico* スクリーニングシステムをテトラペプチド阻害剤の設計に適用し、カスパーゼ-3 の特異配列として Asp-Asn-Leu-Asp(DNLD)配列を見出している(図 20) (95)。よってカスパーゼ-3 の阻害剤として Ac-DNLD-CHO を用いた。ほかのエフェクターカスパーゼ(カスパーゼ-6, -7)の阻害剤はカスパーゼ-7 の阻害剤として Ac-DQTD-CHO を用いた。しかしながら Ac-DQTD-CHO はカスパーゼ-3 も阻害してしまう。カスパーゼ-6 の阻害剤は Ac-VEID-CHO を用いた。特異的なエフェクターカスパーゼ阻害剤の評価は、ウェスタンブロット法によるカスパーゼの開裂の検出、蛍光基質を用いたカスパーゼ活性評価、さらにアポトーシス評価の DNA 断片化の検出を行い、カスパーゼ-3 阻害剤、カスパーゼ-7/3 阻害剤及びカスパーゼ-6 阻害剤の特異性の違いを検討した。

阻害剤	カスパーゼ-3	カスパーゼ-7	カスパーゼ-8	カスパーゼ-9
Ac-DEVD-CHO	0.288	4.48	0.597	1.35
Ac-DNLD-CHO	0.68	55.7	>200	>200

濃度単位：nM

図 20 カスパーゼ-3 阻害剤の阻害能検証(IC₅₀ から計算した解離定数の濃度)

新規のカスパーゼ阻害剤 Ac-DNLD-CHO を Ac-DEVD-CHO と比較した結果、Ac-DNLD-CHO はカスパーゼ-3 に対して特異性が高いことが示された(95)。

3-2. 実験方法

3-2-1. 細胞の培養

実験に用いた **Jurkat** の培養は 2-2-1 項に詳述した。

3-2-2. 細胞に対する薬剤の作用方法

薬剤の作用方法は 2-2-2 項に詳述した。

3-2-3. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法は 2-2-3 項に詳述した。

3-2-4. 蛍光基質を用いたカスパーゼ活性測定

細胞は作用終了後 5 min、4℃、300 *g* で遠心後上清を除去し、PBS で洗浄し、5 min、4℃、300 *g* で遠心洗浄を行い、RIPA buffer(25 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) で可溶化を行い、15 min、4℃、10,800 *g* で遠心を行い上清をカスパーゼ液として回収し、エッペンドルフチューブ中で酵素液 15μL と、caspase buffer (50mM HEPES (pH7.4), 100 mM NaCl, 1mM EDTA・2Na, 0.1% chaps, 10% sucrose, 5 mM DTT) を 185 μL 混合した。200 μL の混合液を 30 min, 30℃の温浴でインキュベーションし、蛍光基質を加え、1 h、30℃ の温浴でインキュベートした。反応液は励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm で測定した。

3-2-5. アガロース電気泳動による DNA 断片化の検出

アガロース電気泳動による DNA 断片化の検出の方法は 2-2-4.項に詳述した。

3-3. 結果

3-3-1. ウェスタンブロット法によるカスパーゼ切断生成物の検出

Fas 誘導によるカスパーゼの開裂を確認した。よって特異的カスパーゼ阻害剤によってカスパーゼの開裂の変化をウェスタンブロットによって検出した(図 21)。

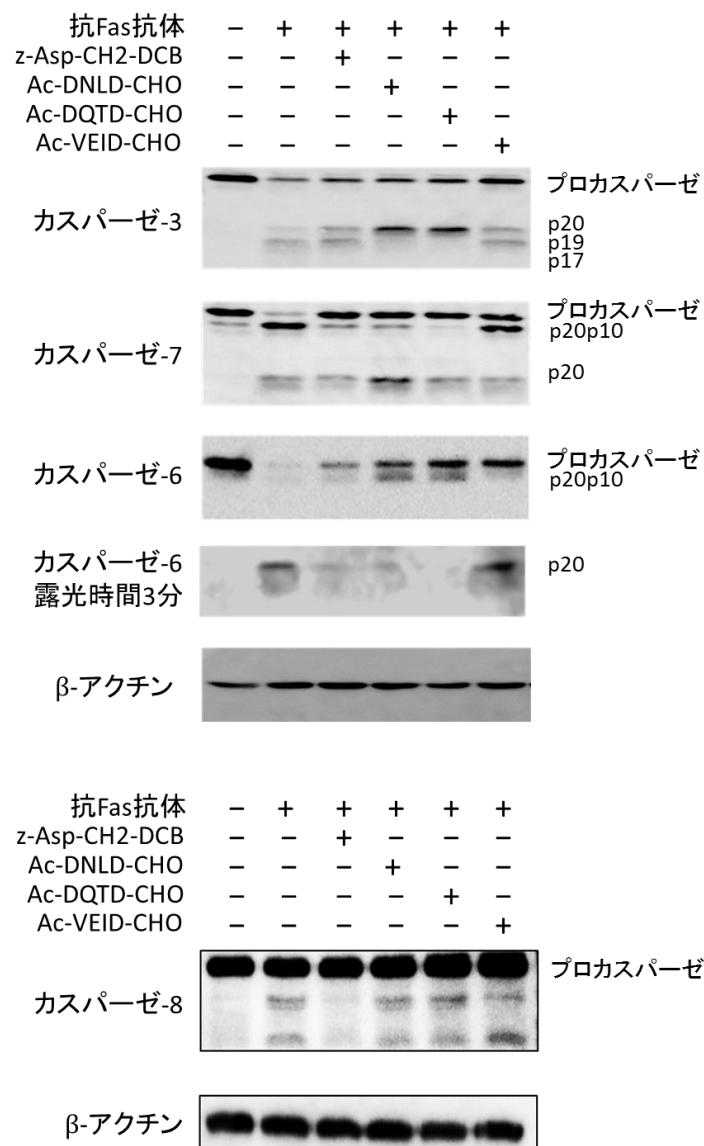


図 21 ウェスタンブロットによるカスパーゼ切断生成物の検出

Jurkat 細胞に z-Asp-CH₂-DCB、Ac-DNLD-CHO、Ac-DQTD-CHO、Ac-VEID-CHO をそれぞれ 50 μM で 1 h で作用させ、抗 Fas 抗体を 0.5 μg/mL で 4 h 作用させた後、細胞を可溶化させた。カスパーゼ阻害剤および抗 Fas 抗体の未作用サンプルも作成し、ウェスタンブロット法によってカスパーゼの開裂状態を解析した。カスパーゼ-6, -7 は p20 の生成が活性化の指標となっている。

3-3-1-1. カスパーゼ-3 の切断生成物の検出

カスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DNLD-CHO とカスパーゼ-7/3 阻害剤 Ac-DQTD-CHO の作用時

は同様の結果となり、プロドメインが完全に残った p20 の状態で検出された。カスパーゼ-6 阻害剤 Ac-VEID-CHO はカスパーゼ-3 に対し影響はでていなかった。

3-3-1-2. カスパーゼ-7 の切断生成物の検出

抗 Fas 抗体によってカスパーゼ-7 は p20p10 と p20 に切断された。カスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DNLD-CHO とカスパーゼ-7/3 阻害剤 Ac-DQTD-CHO の作用時は似た結果となったが違いも現れた。Ac-DNLD-CHO に比べ Ac-DQTD-CHO の方が p20p10 の検出が強く阻害された。抗 Fas 抗体単独作用時では p20p10 が強く検出されているため活性化に p20p10 が活性化に影響していることが示唆された。よって Ac-DNLD-CHO は Ac-DQTD-CHO にくらべカスパーゼ-7 に対する阻害能は弱くカスパーゼ-3 に対する特異性が高いことも確認できた。

3-3-1-3. カスパーゼ-6 の切断生成物の検出

抗 Fas 抗体によってカスパーゼ-7 は p20p10 と p20 に切断された。カスパーゼ-6 に対しても Ac-DNLD-CHO とカスパーゼ-7/3 阻害剤 Ac-DQTD-CHO の作用時は似た結果となり、p20 の検出を阻害し、p20p10 に対して阻害は弱かった。しかしながら、カスパーゼ-6 阻害剤は p20 に対し影響はなく、p20p10 に対し生成を阻害した。

3-3-1-4. カスパーゼ-8 の切断生成物の検出

抗 Fas 抗体によってカスパーゼ-8 も図 17 と同様に切断された。カスパーゼ阻害剤を用いた場合は z-Asp-CH₂-DCB にのみ切断の阻害をうけ、エフェクターカスパーゼ阻害剤では阻害は受けなかった。

3-3-2. DNA 断片化の検出

抗 Fas 抗体の作用により DNA ラダーが生成された。z-Asp-CH₂-DCB、Ac-DNLD-CHO、Ac-DQTD-CHO を作用させた場合、抗 Fas 抗体をさせても DNA ラダーの生成は抑制された。Ac-VEID-CHO 作用では DNA ラダーの生成抑制はされていなかった。よって、カスパーゼ-3 を阻害すると特に DNA ラダーの生成は抑制されることが示された。Ac-VEID-CHO では DNA 断片化の抑制は弱い結果となった(図 22)。

抗Fas抗体	-	+	+	+	+	+
z-Asp-CH ₂ -DCB	-	-	+	-	-	-
Ac-DNLD-CHO	-	-	-	+	-	-
Ac-DQTD-CHO	-	-	-	-	+	-
Ac-VEID-CHO	-	-	-	-	-	+

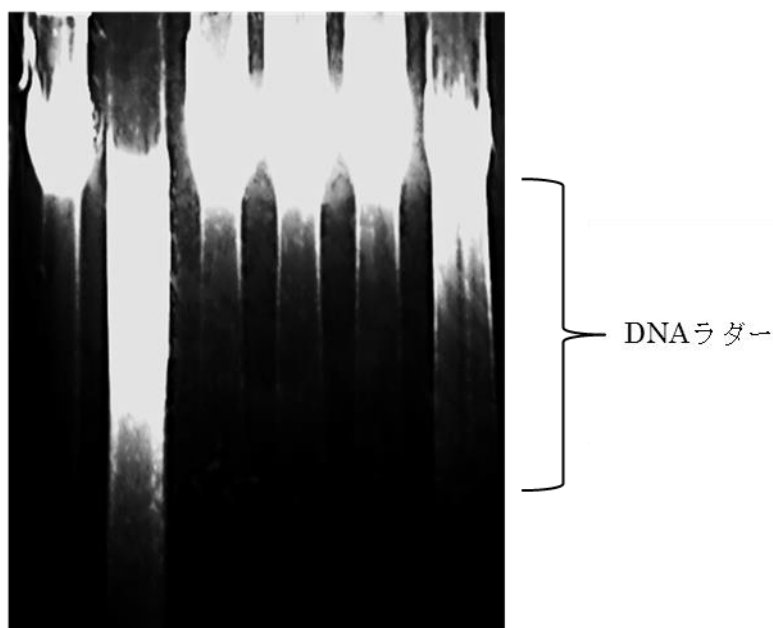


図 22 アガロース電気泳動による DNA 断片の検出

Jurkat 細胞に z-Asp-CH₂-DCB、Ac-DNLD-CHO、Ac-DQTD-CHO、Ac-VEID-CHO をそれぞれ 50 μ M で 1 時間作用させ、抗 Fas 抗体を 0.5 μ g/mL で 6 時間作用させた後、細胞を可溶化させた。カスパーゼ阻害剤および抗 Fas 抗体の未作用サンプルも作成し、アガロース電気泳動によって DNA ラダーを検出した。

3-3-3. 蛍光基質によるカスパーゼ活性の検討

カスパーゼは通常、非活性型として存在するがアポトーシスなどのシグナルにより開裂を起こし活性化型となる。開裂状態はウェスタンブロットで確認でき、図 21 で示した。しかしながら、活性を直接測定したわけではなく開裂を起こしただけかどうかは判断できないため蛍光基質を用いて測定を行った結果、カスパーゼ-7/3 活性測定ではカスパーゼ-7/3 阻害剤作用で特に活性が抑制されていた。しかしながらカスパーゼ-3 阻害剤ではカスパーゼ-6 阻害剤と同等の阻害能だった(図 23)。この結果より、カスパーゼ-7 に対する特異性の違いによるものだと考えられる。カスパーゼ-6 の活性測定では全体的に活性の差が少な

った(図 24)。

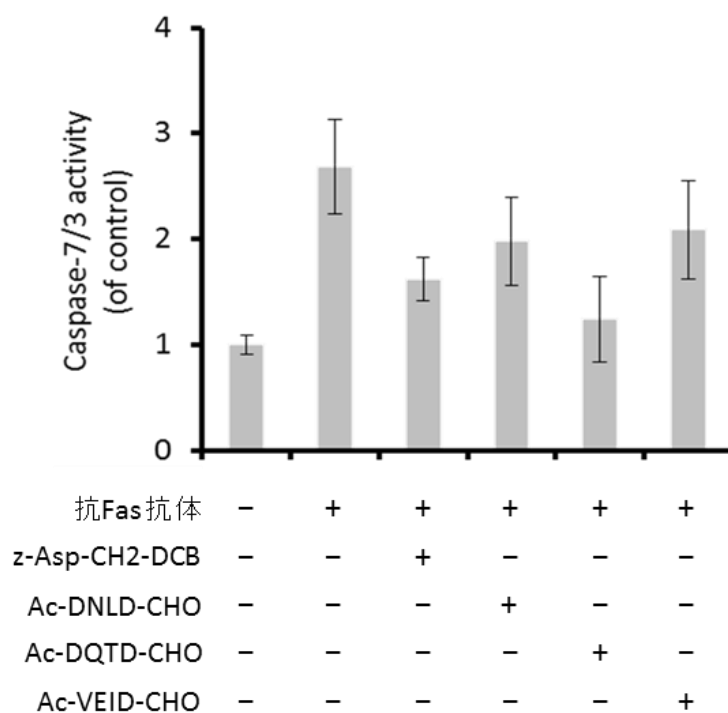


図 23 蛍光基質を用いたカスパーゼ-7/3 活性測定

Jurkat 細胞に z-Asp-CH₂-DCB、Ac-DNLD-CHO、Ac-DQTD-CHO、Ac-VEID-CHO をそれぞれ 50 μ M で 1 時間作用させ、抗 Fas 抗体を 0.5 μ g/mL で 6 時間作用させた後、細胞を可溶化させた。カスパーゼ阻害剤および抗 Fas 抗体の未作用サンプルも作成し、蛍光基質、Ac-DQTD-AMC の分解量をマイクロプレートリーダーで蛍光を測定した。

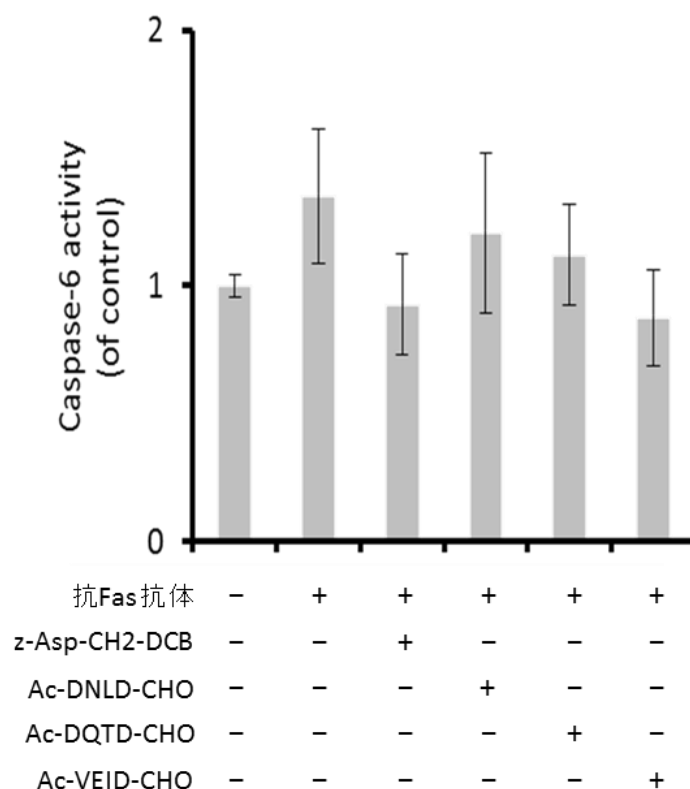


図 24 蛍光基質を用いたカスパーゼ-6 活性測定

Jurkat 細胞に z-Asp-CH₂-DCB、Ac-DNLD-CHO、Ac-DQTD-CHO、Ac-VEID-CHO をそれぞれ 50 μ M で 1 時間作用させ、抗 Fas 抗体を 0.5 μ g/mL で 6 h で処理し、細胞を可溶化させた。カスパーゼ阻害剤および抗 Fas 抗体の未作用サンプルも作成し、蛍光基質、Ac-VEID-AMC の分解量をマイクロプレートリーダーで蛍光を測定した。

3.4. 考察

前章では Fas 始動のカスパーゼ-8 と下流のエフェクターカスパーゼ-3 および汎カスパーゼ阻害剤のみで実験を行った。本章ではエフェクターカスパーゼ、カスパーゼ-3、-7、-6 とそれぞれの特異的阻害剤を用いた。カスパーゼ-3 阻害剤に Ac-DEVD-CHO よりも特異性が高い Ac-DNLD-CHO を用いた。カスパーゼ-7 の阻害には Ac-DQTD-CHO を用いた。カスパーゼ-6 阻害剤には Ac-VEID-CHO を用いた。ウェスタンブロットの結果より、カスパーゼ-3 に対して Ac-DNLD-CHO と Ac-DQTD-CHO の作用は等しく p20 カスパーゼ-3 の状態でとどめていた。よって活性化の条件であるプロドメインの除去された p17 が生成できていないことからカスパーゼ-3 は活性化に至っていないことが示された。Ac-VEID-CHO

作用時ではカスパーゼ-3 は切断が進行していることが確認でき、カスパーゼ-3 が活性化していることが示唆された。

カスパーゼ-7 のウェスタンブロットの結果では、Ac-DNLD-CHO および Ac-DQTD-CHO は似た結果となったが、プロドメインが除去されたカスパーゼ-7(p20p10 カスパーゼ-7)の生成量が異なり、Ac-DQTD-CHO が強く阻害していた。この結果はカスパーゼ-3 への特異性の高さからくるものでAc-DNLD-CHOはカスパーゼ-7に対して阻害が弱いことが分かる。Ac-VEID-CHO 作用時は抗 Fas 抗体単独作用時と p20p10 カスパーゼ-7 の検出量とほぼ等しいことが分かりカスパーゼ-7 の阻害を行っていないことが分かる。

カスパーゼ-6 に対する Ac-DNLD-CHO と Ac-DQTD-CHO の作用も似た結果となり、p20 カスパーゼ-6 の生成を阻害したがプロドメインの除去された、p20p10 カスパーゼ-6 の生成阻害は弱かった。Ac-VEID-CHO では p20p10 カスパーゼ-6 の阻害が強く行われているが p20 カスパーゼ-6 の生成は阻害できていなかった。以上の結果より、エフェクターカスパーゼ-7 に対しての阻害はプロドメインの除去の阻害を行っていると考えられる。

DNA ラダーの生成では Ac-DNLD-CHO、Ac-DQTD-CHO とともに阻害し、Ac-VEID-CHO では阻害は弱かった。DNA ラダーの生成は CAD の働きによるが通常は ICAD が CAD を常時抑制している。しかしカスパーゼ-7 ではなくカスパーゼ-3 が活性化すると ICAD が分解され、CAD が活性化する。よって Ac-DNLD-CHO と Ac-DQTD-CHO によって DNA ラダーの生成に違いが出なかったと考えられる。

カスパーゼの活性評価にウェスタンブロット法を用いたが、カスパーゼの特異的な基質を用いることによっても測定できる。本実験では Ac-DQTD-MCA と Ac-DNLD-MCA を用いた。基質は切断を受け、MCA が分離すると AMC に変化し蛍光を発する。蛍光を測定することによって、カスパーゼの活性を測定できる。結果より Ac-DQTD-CHO を作用させた場合がもっとも Ac-DQTD-MCA(カスパーゼ-7/3)に対する活性が低かった。Ac-DNLD-CHO 作用ではカスパーゼ-3 は阻害されたがカスパーゼ-7 の阻害は弱かったものと考えられる。Ac-VEID-MCA に対する活性評価では Ac-VEID-CHO 作用時で最も低かった。よって蛍光基質を用いたカスパーゼ活性評価とウェスタンブロットによる開裂状態での測定は似た結果となった。以上よりカスパーゼの活性化評価はウェスタンブロットでも行えるが具体的な評価を行う場合は基質を用いて値を測定する方がいいことが示された。

第4章 カスパーゼ-6 阻害剤は 7A6 抗原のミトコンドリア局在を抑制する

4-1. 背景

前章では、特異的カスパーゼ阻害剤を用いて特異性、阻害能を検討した。ほかの研究グループのカスパーゼ阻害による 7A6 の実験は行われてきたが、汎カスパーゼ阻害剤や Ac-DEVD-CHO による特異性の低い阻害剤での実験だった(98, 99, 100)。本章では特異的なカスパーゼ阻害剤を用いるとともに、カスパーゼ-3 を欠損した MCF7 細胞を用いた。MCF7 細胞はヒト乳腺癌由来でありカスパーゼ-3 遺伝子が欠損している。よってカスパーゼ経路の研究として有用である。以上の条件によってカスパーゼと 7A6 のミトコンドリア局在を FCM で検出し検討した。

4-2. 方法

4-2-1. 細胞培養

実験に用いた Jurkat 細胞の培養は 2-2-1.項に詳述した。MCF7 細胞の培養には DMEM 培地(5 mM HCl, 50 μ M 2-メルカプトエタノール、24 mM 炭酸水素ナトリウム、ペニシリン・ストレプトマイシン)を用い FBS を 10%になるように添加し、0.02 μ m フィルターを通して滅菌したものを用いた。また培養条件は、インキュベーター内で CO₂ 濃度 5%、37°C で培養を行った。

4-2-2. MCF7 細胞に対する薬剤の作用方法

直径 60 mm 細胞培養ディッシュを用い、DMEM 培地 5 mL 中に 1×10^6 cells/dish となるように播種後、オーバーナイトさせディッシュに接着させた。タモキシフェンを 25 μ M になるように 24 h 作用させた。

4-2-3. フローサイトメトリーによる 7A6 抗原の検出

Jurkat 細胞での方法は 2-2-4.に詳述した。タモキシフェン作用後の細胞の培地を除去後、PBS で洗浄し 0.5%トリプシン-PBS で細胞を剥離させ 300 g で遠心分離し回収した。回収した細胞に 20 μ g/mL digitonin-5% BSA-PBS で 20 min 氷冷し、5min、4°C、300 g で遠心後、上精を除去した。0.5% BSA/PBS で Apo2.7-PC5 を 1:100 で希釈し、37°Cで 1 h 作用させた。作用後、PBS で 3 回洗浄し、フローサイトメーターである FACSCalibur で PC5 の蛍光強度を測定することにより 7A6 を定量した。

4-3. 結果

4-3-1. カスパーゼ阻害による 7A6 の阻害

抗 Fas 抗体による 7A6 のミトコンドリア局在をカスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DNLD-CHO、カスパーゼ-7/3 阻害剤 Ac-DQTD-CHO、カスパーゼ-6 阻害剤 Ac-VEID-CHO それぞれを作用させることによって検討した。結果よりカスパーゼ-3, -7/3, -6 阻害剤それぞれが 7A6 ミトコンドリア局在を抑制し、カスパーゼ-6 阻害剤のみ有意な減少が見られた。(図 25)。

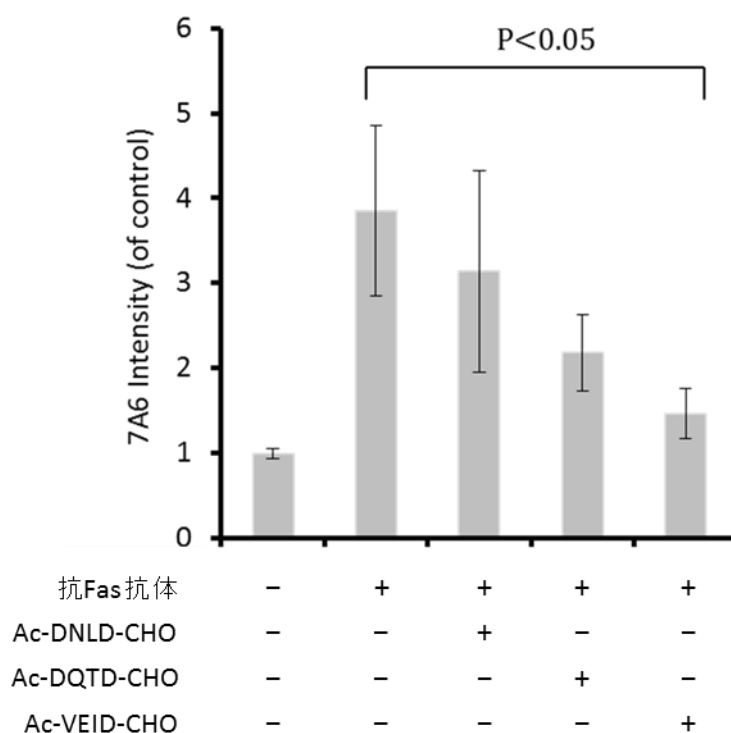


図 25 フローサイトメトリーによる 7A6 抗原の検出

抗 Fas 抗体を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6 h で処理し、ジギトニンによって細胞膜透過性にし、赤色蛍光色素 PC5 を結合させた Apo2.7 を作用させた。蛍光強度を FCM で解析した。

4-3-2. 7A6 の検出量と p20p10 カスパーゼ-6 の生成量の相関性

前述のごとく FCM によって 7A6 は特にカスパーゼ-6 によって制御されていることが示唆された(図 25)。緒言でカスパーゼは大サブユニットと小サブユニットのヘテロ四量体が活性を持つと説明した。カスパーゼ-6 のウェスタンブロットの結果では、カスパーゼ-3 阻害剤とカスパーゼ-7/3 阻害剤では活性化型の指標の p20 カスパーゼ-6 の生成が阻害されて

いた(図 21)。カスパーゼ-6 の Asp178 はカスパーゼ-3 によって切断を受け活性化することが示唆されている。カスパーゼ-6 阻害剤は p20 カスパーゼ-6 の生成は阻害できていなかったが、プロドメインの切断された p20p10 カスパーゼ-6 の生成が阻害されており、カスパーゼ-3, -7/3 阻害剤では p20 カスパーゼ-6 の生成は阻害を完全にはしていなかった。そこでウェスタンブロット法によって検出した p20p10 カスパーゼ-6 を Image J によって数値化したところ(図 26)、4-3-1.の結果と相関することが確認された。よって p20p10 カスパーゼ-6 の活性が、7A6 に対し影響を与えたものと考えられる。さらに、カスパーゼ-6 阻害剤は p20 カスパーゼ阻害剤の生成は阻害できないが活性化型のカスパーゼの活性を阻害していると考えられる。

カスパーゼ-7 もカスパーゼ-6 と同様に p20p10 カスパーゼ-7 の生成量を Image J によって数値化した(図 27)。結果より、カスパーゼ-6 とは異なり、p20p10 カスパーゼ-7 生成量と 7A6 の検出量とは相関関係は示さなかった。しかしながら、p20p10 カスパーゼ-7 生成量は蛍光基質を用いたカスパーゼ-7 の活性測定の数値と相関した。よって、カスパーゼ-7 ではなくカスパーゼ-6 が 7A6 を制御していることが示唆された。

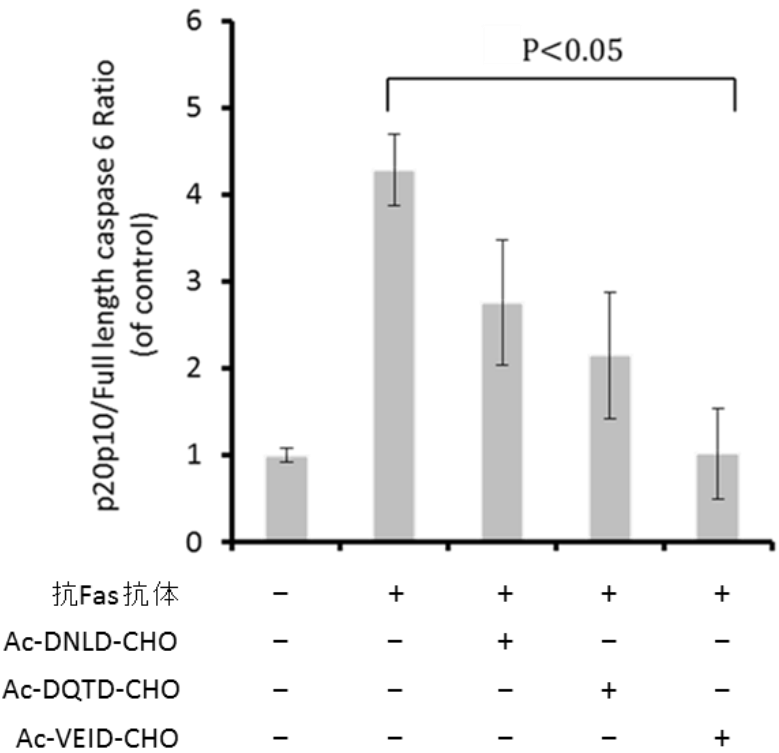


図 26 ウェスタンブロット法によって検出した p20p10 カスパーゼ-6 の数値化

カスパーゼ-6 の p20p10 の検出量に着目し、Image J によって数値化した結果、7A6 の検出量(図 26)と相関した。

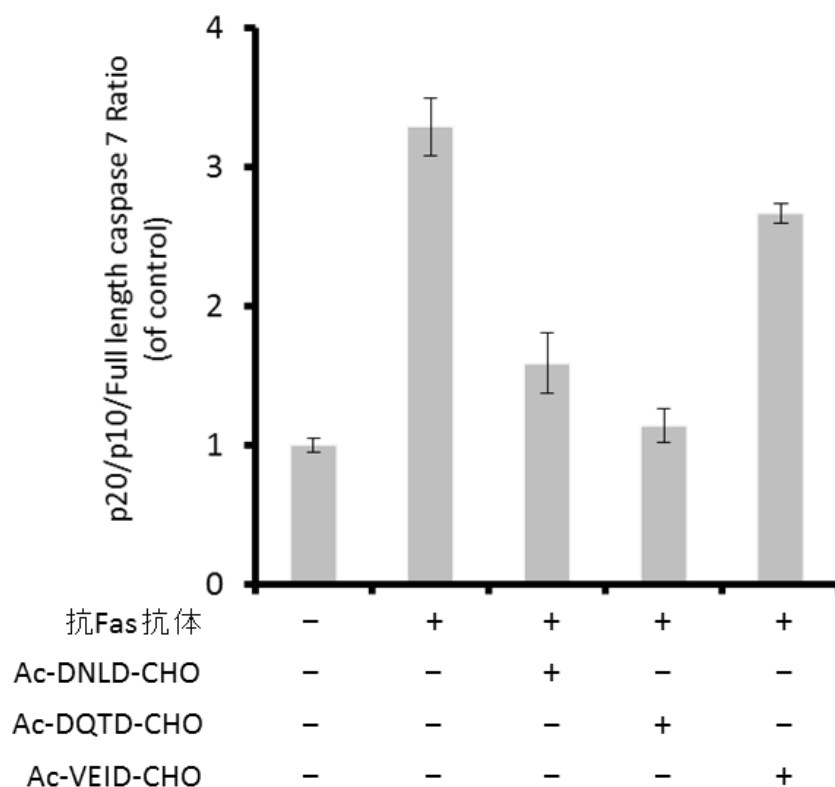


図 27 ウェスタンブロット法によって検出した p20p10 カスパーゼ-7 の数値化
カスパーゼ-7 の p20p10 の検出量を、Image J によって数値化した結果。

4-3-3. ウェスタンブロット法によるカスパーゼ開裂の検出

今までの実験ではエフェクターカスパーゼ阻害剤を用いてきたが、イニシエーターカスパーゼも検討するためにカスパーゼ-8 阻害剤 Ac-IETD-CHO とカスパーゼ-9 阻害剤 Ac-LEHD-CHO、さらに Ac-DEVD-CHO も用いて検討することにした。抗 Fas 抗体誘導によるカスパーゼの開裂を確認した(図 28)。結果よりカスパーゼ-3 の切断阻害は z-Asp-CH2-DCB、Ac-DEVD-CHO、Ac-IETD-CHO によって阻害された。カスパーゼ-7 では p20p10 カスパーゼ-7 の生成は z-Asp-CH2-DCB、Ac-DEVD-CHO、Ac-IETD-CHO によって阻害された。とくに Ac-IETD-CHO では p20 の生成も阻害された。カスパーゼ-6 も z-Asp-CH2-DCB、Ac-DEVD-CHO、Ac-IETD-CHO によって特に阻害されたと考えられる。カスパーゼ-8 も z-Asp-CH2-DCB、Ac-DEVD-CHO、Ac-IETD-CHO によって阻害されたがとくに Ac-IETD-CHO において p43/p41 切断生成は阻害された。

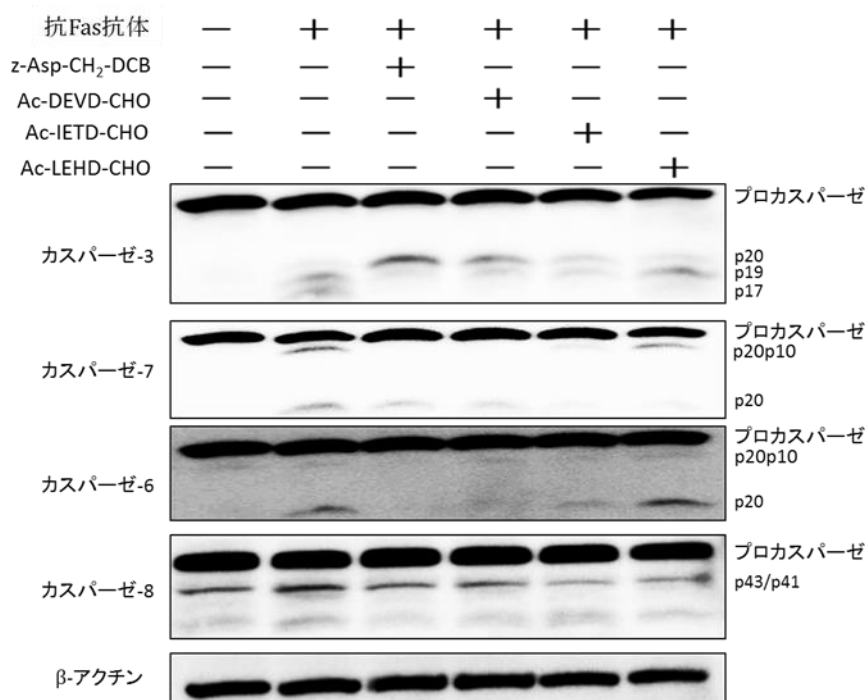


図 28 ウェスタンブロットによるカスパーゼ開裂の検出

Jurkat 細胞に z-Asp-CH₂-DCB、Ac-DEVD-CHO、Ac-IETD-CHO、Ac-LEHD-CHO をそれぞれ 50 μ M で 1 h で処理し、抗 Fas 抗体を 0.5 μ g/mL で 4 h 作用させた後、細胞を可溶化(タンパク質サンプル)させた。カスパーゼ阻害剤および抗 Fas 抗体の未作用サンプルも作成し、ウェスタンブロット法によってカスパーゼの開裂状態を解析した。カスパーゼ-6, -7 は p20 の生成が活性化の指標となっている。

4-3-4. カスパーゼ阻害剤による 7A6 の解析

今までに用いてきたカスパーゼ阻害剤によって 7A6 のミトコンドリア局在の解析を FCM で行った(図 29)。横軸が 7A6 の検出量、縦軸は細胞数を示している。——|で示した範囲を 7A6 がミトコンドリアに局在していると見なした。結果より抗 Fas 抗体単独処理時では 7A6 は最も検出され、カスパーゼ-8 阻害剤 Ac-IETD-CHO 処理時では最も検出が少なかった。カスパーゼ-3 阻害剤の Ac-DEVD-CHO では 7A6 の検出が z-Asp-CH₂-DCB と Ac-IETD-CHO と同様に 7A6 の検出が減少した。カスパーゼ-9 阻害剤 Ac-LEHD-CHO では検出量の減少は少なく、カスパーゼ-8 などの非特異的な阻害によって 7A6 の検出量が減少したと考えられる。

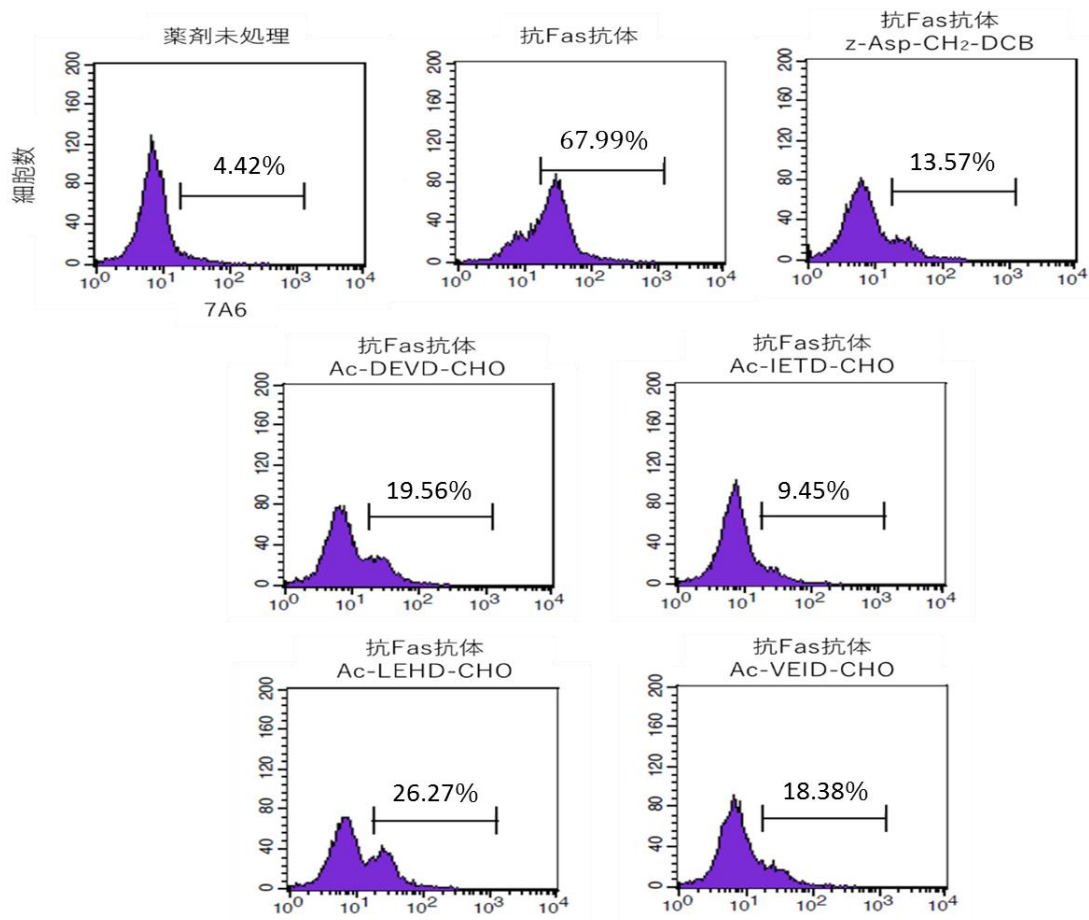


図 29 フローサイトメトリーによる 7A6 抗原の検出

抗 Fas 抗体を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6 h で処理し、ジグトニンによって細胞膜透過性にし、赤色蛍光色素 PC5 を結合させた Apo2.7 を作用させた。蛍光強度を FCM で解析した。

4-3-5. カスパーゼ-3 欠損細胞を用いた 7A6 解析

図 26 より、カスパーゼ阻害剤によって 7A6 のミトコンドリア局在にはエフェクターカスパーゼのカスパーゼ-3 ではなくカスパーゼ-6 が特に重要であることが示唆された。

カスパーゼ-3 欠損細胞、MCF7 細胞に対しタモキシフェンを作用させ 7A6 の検出を FCM で解析した(図 30)。横軸が 7A6 の検出量、縦軸は細胞数を示している。——で示した範囲を 7A6 がミトコンドリアに局在していると見なした。タモキシフェン未作用時では —— の範囲は 1.8%であったのに対し、タモキシフェン作用時では 43.1%であった。よって 7A6 のミトコンドリア局在にはカスパーゼ-3 が必要でないことが示された。

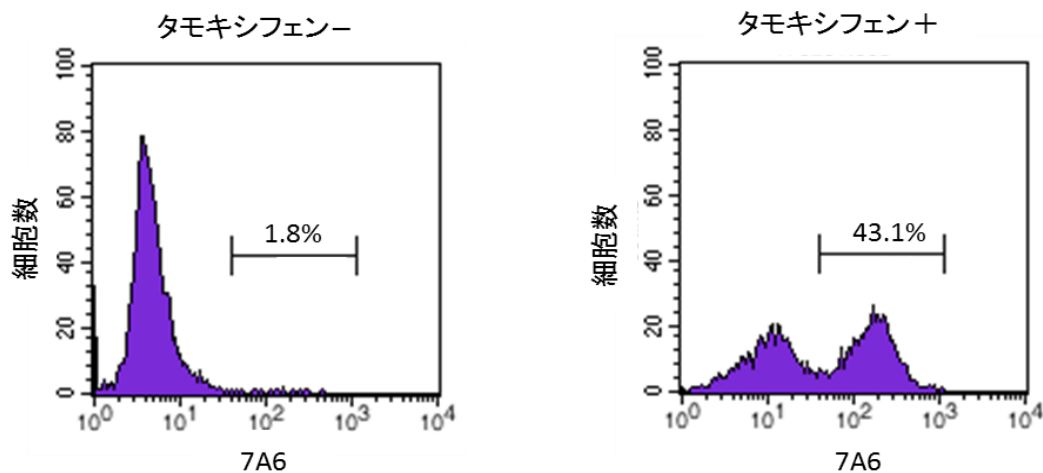


図 30 MCF7 細胞の 7A6 の検出

抗 Fas 抗体を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6 h で処理し、ジギトニンによって細胞膜透過性にし、赤色蛍光色素 PC5 を結合させた Apo2.7 を作用させた。蛍光強度を FCM で測定し解析した。

4-4. 考察

ウェスタンブロット法と蛍光基質によるカスパーゼ活性測定によって Ac-DNLD-CHO はカスパーゼ-3 に特異的であり、Ac-VEID-CHO はカスパーゼ-6 に特異的であることが確認できた。よって Ac-DNLD-CHO、Ac-DQTD-CHO、Ac-VEID-CHO を作用させた状態で抗 Fas 抗体処理した。作用後に Apo2.7-PC5 によって 7A6 を検出した。結果より、カスパーゼ阻害剤未作用時には 7A6 の検出量が有意に増加した。カスパーゼ阻害剤を作用させていた場合は 7A6 の検出量は減少した。しかしながら、カスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DNLD-CHO 作用時の減少量は最も少なく、カスパーゼ-6 阻害剤 Ac-VEID-CHO 作用時では 7A6 の減少量は最も多く有意であった。よって Fas 誘導経路において 7A6 の上流にはカスパーゼ-6 が位置していることが示唆された。

7A6 はカスパーゼ-6 によって制御されていることが示唆されたが 7A6 の FCM による検出量とウェスタンブロットによる p20p10 カスパーゼ-6 の検出量が似ていることに気付いた。よってウェスタンブロット法による p20p10 カスパーゼ-6 の検出量とプロカスパーゼ-6 の検出量を Image J によって数値化し、p20p10 カスパーゼ-6 の検出量をプロカスパーゼ-6 検出量で割った数値をグラフ化し解析したところ、FCM による 7A6 の検出量と相関が認められた。通常カスパーゼは、大サブユニットと小サブユニットのヘテロ四量体となって活性を持つと考えられているが p20p10 カスパーゼ-6 も活性があることが分かっている。よって 7A6 はカスパーゼ-6 に制御されていることが示唆された。

カスパーゼ-7もカスパーゼ-6と同様に p20p10 カスパーゼ-7 の生成が確認された(図 21)。さらにカスパーゼ-7 活性測定の値と p20p10 カスパーゼ-7 の生成量が相関した。よって p20p10 カスパーゼ-7 も p20p10 カスパーゼ-6 と同様に活性があることが示唆されたが、7A6 の制御に係わっていないことも示唆された。

カスパーゼ-8 阻害時でも 7A6 の検出量は減少した。抗 Fas 抗体はカスパーゼ-8 を活性化させ下流のカスパーゼを活性化に導くと説明したが、本実験ではカスパーゼ-8 の阻害時には下流のカスパーゼ-6 の活性化も阻害され 7A6 の検出量が減少したことが示唆された。

阻害剤を用いた実験においてはカスパーゼ-6 が 7A6 を制御していると示唆されたが、カスパーゼ-3 を阻害しても減少した。よってカスパーゼ-3 欠損細胞 MCF7 を用いて解析した。結果より MCF7 細胞でも 7A6 は FCM によって検出でき 7A6 に対しカスパーゼ-3 は必要がないことが示された。

第5章 カスパーゼ-6 ノックダウンに伴う 7A6 抗原のミトコンドリア局在抑制

5-1. 背景

7A6 はカスパーゼ-6 阻害剤で抑制されることが分かったが、特異的な阻害剤でも非特異的な阻害は生じる。実際、Ac-DNLD-CHO と Ac-DQTD-CHO の違いも検証した。よって非特異的な阻害を排除するため、siRNA によってカスパーゼ-6 のノックダウン実験を試みた。

siRNA (short interfering RNA) は RNAi (RNA interference) と呼ばれる 21~23mer の二本鎖 RNA によって特異的に mRNA、発現抑制が行われる現象である。RNAi は 1998 年に Fire らによって線虫にて見出されたが(101)、2001 年に Elbashir らにより哺乳類細胞でも siRNA による配列特異的な発現抑制が可能であることが証明された(202)。siRNA によるノックダウン原理は siRNA をエレクトロポレーション等で細胞内へ導入すると、siRNA のセンス鎖が分解される。分解されずに残ったアンチセンス鎖に RISC (RNA-induced silencing complex) が結合し複合体が生成された後に、特異的に mRNA をセンス鎖として二本鎖 RNA となり、mRNA が分解を受けノックダウンされる(102)。

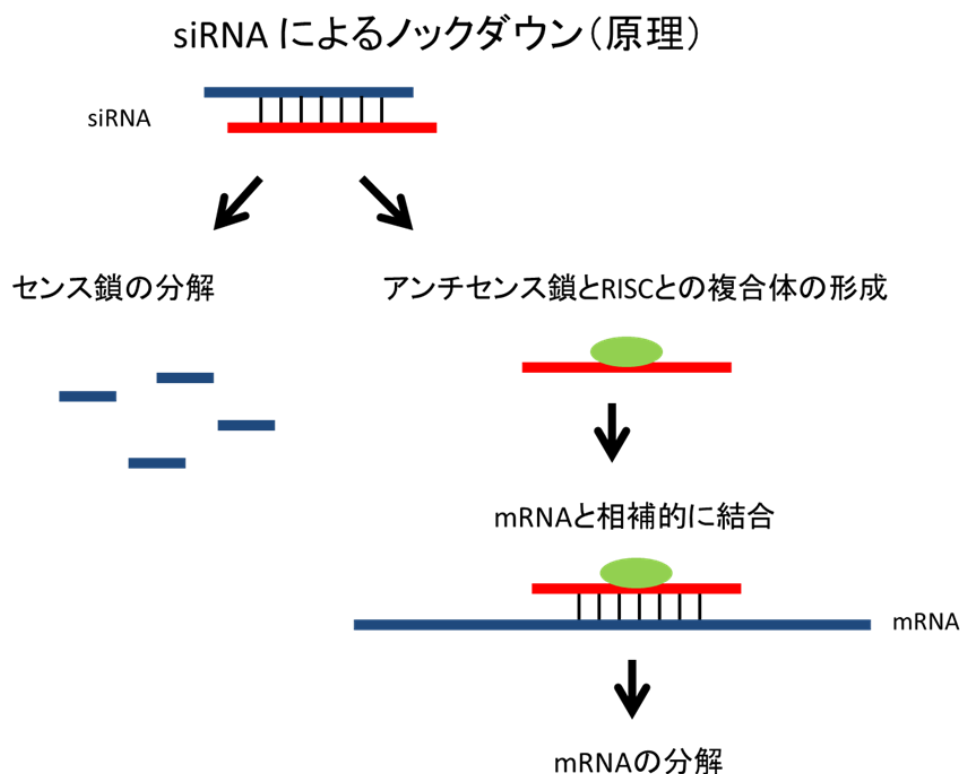


図 31 siRNA によるノックダウン

特異的な siRNA を細胞内に導入するとセンス鎖が分解を受ける。残ったアンチセンス鎖に細胞内のタンパク質を利用し、mRNA に結合させると mRNA が分解を受け、ノックダ

ウンが完了する。

5-2. 方法

5-2-1. 細胞培養

実験に用いた Jurkat の培養は 2-2-1.項に詳述した。

5-2-2. 細胞への siRNA 導入

細胞への導入は Neon Transfection System(Thermo Fisher Scientific)を用いた。Jurkat 細胞を 5min、4°C、300 *g* で遠心分離によって RPMI1640 培地を除去し、PBS によって懸濁後エッペンドルフチューブに移した。5 min、4°C、300 *g* で遠心分離によって PBS を除去後、チューブ内の細胞(2×10^6 cells)に Neon Transfection System の Buffer R を 39 μ L 加え懸濁した。懸濁後、10 μ M siRNA を 1 μ L 加え懸濁しエレクトロポレーション法(Neon Transfection System)で siRNA を 10 ms、3 パルス、1350 V の条件で導入した。導入によるノックダウンの効果はカスパーゼ-6 の発現量をウェスタンブロット法で確認した。

5-3. 結果

5-3-1. カスパーゼ-6 の siRNA によるノックダウン

Santa cruz から購入したカスパーゼ-6 に特異的な siRNA とノックダウンに影響しないコントロール siRNA によってノックダウンを行いウェスタンブロット法によって検出した。結果より完全ではないがノックダウンの確認ができた(図 32)。

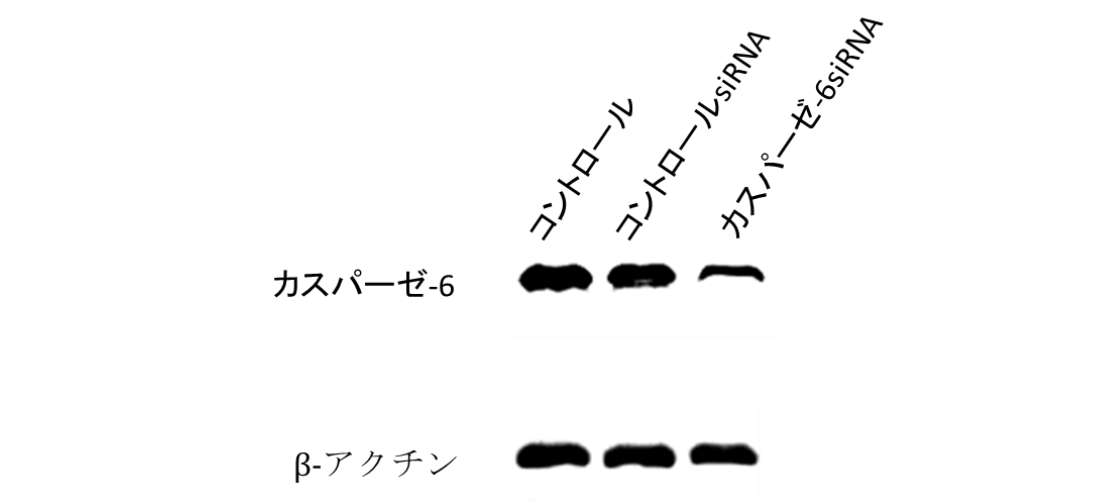


図 32 特異的 siRNA によるカスパーゼ-6 ノックダウン実験

カスパーゼ-6 を siRNA によってノックダウンを試みた。ウェスタンプロットによってカスパーゼ-6 の発現量を解析したところ、完全ではないが減少していることを確認した。

5-3-2. カスパーゼ-6 ノックダウンによる 7A6 のミトコンドリア局在の解析

カスパーゼ-6 のノックダウン細胞を用いて Fas 誘導による 7A6 局在の変化をフローサイトメトリーで検出したところ、コントロール siRNA で上昇が確認でき、ノックダウン細胞ではコントロール siRNA に比べ減少した(図 33)。

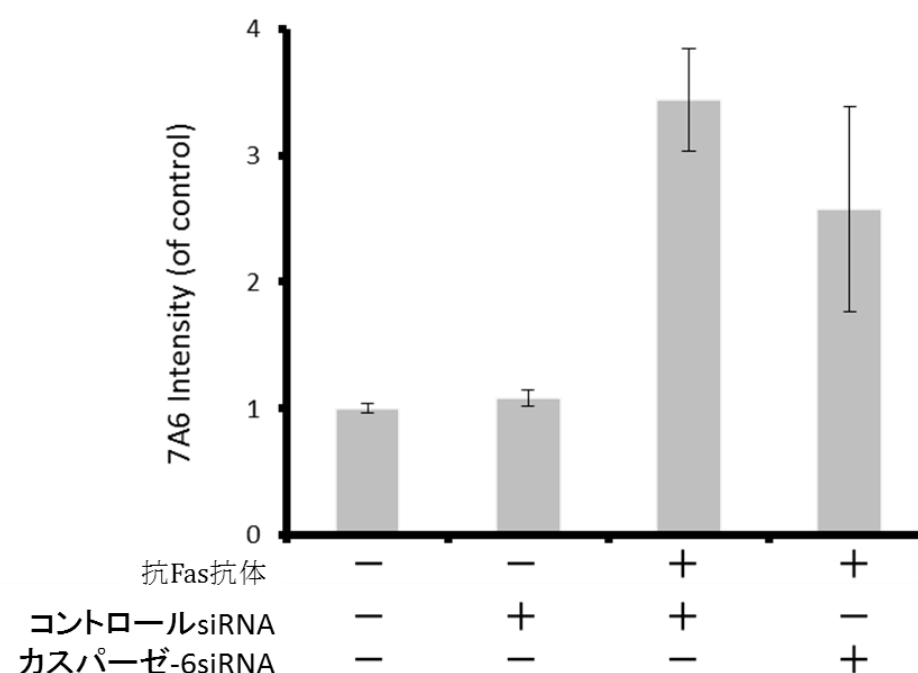


図 33 カスパーゼ-6 ノックダウン時における 7A6 抗原の検出

カスパーゼ-6 をノックダウンした Jurkat 細胞を用いて実験を行った。抗 Fas 抗体を 0.5 $\mu\text{g/mL}$ で 6 h で処理し、ジギトニンによって細胞膜透過性にし、赤色蛍光色素 PC5 を結合させた Apo2.7 を作用させた細胞の蛍光強度を FCM で解析した。

5-4. 考察

阻害剤の非特異的な影響を除外するため、カスパーゼ-3 欠損細胞 MCF7 を用いて 7A6 に対しカスパーゼ-3 は関係ないことを示した。カスパーゼ-6 に対しては RNA 干渉を用いた siRNA によってカスパーゼ-6 のノックダウンを試みた。結果としては完全な発現阻害ではないが発現量の減少を確認し、FCM で 7A6 の解析を行った。ノックダウンを行っていない Jurkat 細胞では 7A6 の検出量の増加を確認した。カスパーゼ-6 のノックダウン Jurkat 細胞でも抗 Fas 抗体によって 7A6 の検出量は増加したがノックダウンを行っていない Jurkat 細胞より減少した。siRNA によるノックダウンはカスパーゼ阻害剤とは違い非特異的な阻害はないと考えられ、カスパーゼ-6 の影響のみと考えられる。さらに図 24 の結果より、z-VEID-CHO 作用時でもカスパーゼ-7 の活性化阻害は行われていなかったことから、7A6 はカスパーゼ-6 に制御されていると考えられる。

第6章 総合討論

抗 Fas 抗体は Fas を活性化させカスパーゼ-8 活性に導く。活性化したカスパーゼ-8 はエフェクターカスパーゼを直接または内因性経路を通してカスパーゼ-9 を活性化させ、エフェクターカスパーゼを活性化させる。本実験でも白血病細胞株 Jurkat に対し、抗 Fas 抗体を作用させるとカスパーゼ-8, -3 の開裂も確認した。さらにアガロース電気泳動によって DNA ラダーも確認した。汎カスパーゼ阻害剤 z-Asp-CH₂-DCB を事前に作用させた後に抗 Fas 抗体を作用させると、カスパーゼ-8, -3 の開裂が阻害され、DNA ラダーの生成は完全に阻害された。7A6 のミトコンドリア局在は Jurkat 細胞にジギトニン作用させ細胞膜に透過性を持たせ、蛍光色素を結合させた抗 7A6 抗体、Apo2.7-PC5 を作用させ 7A6 と結合させた後、共焦点顕微鏡で 7A6 の局在場所を確認し、FCM で 7A6 を定量した。共焦点顕微鏡の Jurkat 細胞にはあらかじめ Mitotracker green で処理し、観察した結果、抗 Fas 抗体処理時では、7A6 はミトコンドリアに局在していることが確認できた。よって FCM で検出した 7A6 もミトコンドリアに局在していることが分かる。FCM で測定すると、抗 Fas 抗体を作用させると未作用に比べ有意に上昇した。さらに z-Asp-CH₂-DCB を作用させて抗 Fas 抗体を作用させた場合は抗 Fas 抗体単独作用に比べ有意に減少した。カスパーゼを阻害すると 7A6 のミトコンドリア局在も減少することを本実験でも示した。さらにカスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DEVD-CHO でも 7A6 のミトコンドリア局在が減少することが報告されている。しかしながら、Ac-DEVD-CHO は特性が低いことが報告されており、カスパーゼ-3 以外も強く阻害されている可能性がある。よって特異性の高いエフェクターカスパーゼを用いる必要があると考えカスパーゼ-3 の阻害剤には Ac-DNLD-CHO、カスパーゼ-6 の阻害剤は Ac-VEID-CHO を用いた。カスパーゼ-7 については単独で阻害する阻害剤はまだ見出されてないためカスパーゼ-7/3 阻害剤 Ac-DQTD-CHO を用いた。ウェスタンブロットではカスパーゼ-3 の開裂を見るとカスパーゼ-3 阻害剤とカスパーゼ-7/3 阻害剤では違いが見られず開裂が同様に阻害され、カスパーゼ-6 阻害剤では開裂に対し影響はなかった。カスパーゼ-7 の開裂ではカスパーゼ-3 阻害剤とカスパーゼ-7/3 阻害剤は似た結果となったが違いもあった。カスパーゼ-7 の開裂は抗 Fas 抗体によって p20p10 カスパーゼ-7 と p20 カスパーゼに切断されることが分かった。カスパーゼ阻害剤は p20 カスパーゼ-7 への切断は阻害できなかった。しかしカスパーゼ-3 阻害剤及びカスパーゼ-7/3 阻害剤は p20p10 カスパーゼへの切断を阻害した。特にカスパーゼ-7/3 阻害剤はカスパーゼ-3 阻害剤よりも強く阻害した。この結果より、カスパーゼ-3 阻害剤とカスパーゼ-7/3 阻害剤との特異性の違いがあることが分かった。カスパーゼ-6 阻害剤はカスパーゼ-7 に対しても影響が無いこともわかった。カスパーゼ-6 の開裂でもカスパーゼ-3 阻害剤とカスパーゼ-7/3 阻害剤は同様に p20 カスパーゼ-6 への切断を阻害した。カスパーゼ-6 は D178 にカスパーゼ-3 認識されるためであると考えられる。しかし p20p10 カスパーゼ-6 への切断阻害はあまり行われなかった。

カスパーゼ-6 阻害剤は p20 カスパーゼ-6 への切断は阻害できなかったが、p20p10 カスパーゼ-6 への切断は阻害した。

Fas 誘導による 7A6 のミトコンドリア局在に対するカスパーゼ阻害実験ではカスパーゼ-3, -7/3, -6 阻害剤で減少が見られ、特にカスパーゼ-6 阻害剤で有意な減少が確認できた。この結果より、カスパーゼ-6 が 7A6 を制御していることが示唆された。ウェスタンブロット法によってわかったカスパーゼ-6 阻害剤の特徴は p20p10 カスパーゼ-6 の生成を特に阻害するものだった。よって p20p10 カスパーゼ-6 の生成量を Image J によって数値化した結果、7A6 の検出量と p20p10 カスパーゼ-6 の生成量が相関することを見出した。カスパーゼはテトラマーになることによって活性化型となると考えられている。上記の結果より、p20p10 カスパーゼも活性を持つことが示唆され、ほかの研究でもわかっている。つまりカスパーゼ-3 阻害剤によってカスパーゼ-3 を阻害すると p20 と p10 カスパーゼ-6 の活性化型の生成が阻害されるが p20p10 カスパーゼ-6 は阻害されない。カスパーゼ-6 阻害剤では p20p10 カスパーゼ-6 の生成を阻害し、生成された活性化型には直接作用し阻害している可能性がある (図 32)。蛍光基質を用いたカスパーゼ-6 活性評価の結果でもカスパーゼ-6 阻害剤が最もカスパーゼ-6 の活性を抑制していることから考えられる。

7A6 とカスパーゼ-6 の関係をより明確にするために、siRNA によるカスパーゼ-6 のノックダウンを行い、カスパーゼ-6 の発現量の減少をウェスタンブロット法によって確認した。ノックダウンに影響を与えないコントロール siRNA 導入細胞では Fas 誘導アポトーシスに対して 7A6 のミトコンドリア局在は上昇した。カスパーゼ-6 ノックダウン細胞では Fas 誘導アポトーシスによる 7A6 のミトコンドリア局在はコントロール siRNA に比べ減少した。以上の実験結果より 7A6 はカスパーゼ-6 によって制御されていることが分かった。

エフェクターカスパーゼ-6 はアポトーシスを誘導するカスパーゼとして認識されている。しかし、活性化型カスパーゼ-6 を導入しただけでは、アポトーシスは誘導されないことが示された。一方で、カスパーゼ-6 の阻害はアポトーシスの進行に影響するとの報告があり、本実験でも阻害剤で DNA 断片化に対し若干の抑制を確認している。

ミトコンドリアはアポトーシスにおいて中心的な役割を持つオルガネラであるがネクロプトーシスやオートファジーともかかわっている。さらに 7A6 抗原はアポトーシス性の刺激によって活性化したカスパーゼ-6 によってミトコンドリア局在することを確認した。このことにより 7A6 はアポトーシスだけではなくネクロプトーシスやオートファジーなどの細胞死とかかわっている可能性もある。7A6 抗原はアポトーシス性の刺激によりミトコンドリアに局在することが確認された。さらに汎カスパーゼ阻害剤によって抑制されることも報告されていることから、カスパーゼ依存経路によってアポトーシスが進行する抗 Fas 抗体を用いて 7A6 抗原とカスパーゼとの関係性を検討した。

抗 Fas 抗体を Jurkat 細胞に作用させるとカスパーゼ開裂及び DNA 断片化が抑制され、7A6 抗原のミトコンドリア局在も抑制されていた。この結果より、抗 Fas 抗体はカスパーゼの活性を介しアポトーシス及び 7A6 抗原のミトコンドリア局在を確認した。

特異的エフェクターカスパーゼ阻害剤の作用確認実験では、カスパーゼ-3 阻害剤 Ac-DNLD-CHO 及びカスパーゼ-7/3 阻害剤 Ac-DQTD-CHO の特異性に違いがあることを PARP1 開裂及びカスパーゼ活性評価によって確認した。DNA 断片化は、Ac-DNLD-CHO 及び Ac-DQTD-CHO に差異はなかった。カスパーゼ-6 阻害剤 Ac-VEID-CHO では PARP1 開裂、DNA 断片化の抑制能は弱くアポトーシスは進行していると考えられる。さらにカスパーゼ-6 の開裂では p20 カスパーゼ-6 の発現を抑制できていなく、プロドメインの欠損した p20p10 カスパーゼ-6 の発現を完全に抑制していた。

Fas 誘導による 7A6 局在に対するカスパーゼ阻害実験ではカスパーゼ-6 阻害剤で有意な減少が見られた。ウェスタンブロット法の結果より、p20p10 カスパーゼ-6 の発現量がカスパーゼ-6 阻害剤によって特に阻害されていたため、Image J によって数値化した結果、7A6 の検出量と p20p10 カスパーゼ-6 の発現量が相関することを見出した。

カスパーゼ-6 に刺激が加わると Asp23 で切断を受けプロドメインが排除されると考えられる。カスパーゼ-6 阻害剤 Ac-VEID-CHO は Asp23 の切断を阻害することが示唆された(図 34)。プロドメインが切断された p20p10 カスパーゼ-6 は活性を持つことが示されており、本実験でも示唆された。カスパーゼ-3 が活性化していると Asp178 が切断され、大サブユニットと小サブユニットに分かれる。小サブユニットには Asp178 から Asp193 までリンカーと呼ばれる配列が残っているが、Asp193 で切断されると考えられる。最終的に二つの大サブユニットと二つの小サブユニットのヘテロ四量体になると考えられている。本実験では Ac-VEID-CHO の作用では p20 の発現阻害は行えていないことが確認されたが、活性を抑制していることも確認した。よって Ac-VEID-CHO は四量体の形成も阻害しているか、形成された四量体に作用し活性を阻害しているものと考えられる。よってカスパーゼ-3 を阻害した場合、活性化型の四量体の形成は阻害できるが活性を持つ p20p10 カスパーゼ-6 は阻害できず、7A6 のミトコンドリア局在に影響が少なかったと考えた。Ac-VEID-CHO を用いた場合はカスパーゼ-6 を阻害できるため 7A6 に対して影響が大きかったと考えた。

7A6 とカスパーゼ-6 の関係をより明確にするために、カスパーゼ-3 欠損細胞の MCF7 細胞を用いて解析したところ Jurkat 細胞と同様に 7A6 の検出が行えた。蛍光基質を用いたカスパーゼ活性測定ではカスパーゼ-6 阻害時にはカスパーゼ-7 の活性化を誘導されていたことから 7A6 にはカスパーゼ-3/7 は影響しないことが示せた。さらに siRNA によるカスパーゼ-6 のノックダウンを行い、発現量をウェスタンブロット法によって確認し、発現量の減少を確認した。よって抗 Fas 抗体誘導による 7A6 抗原の検出を行ったところ、コントロール siRNA では抗 Fas 抗体単独と同様に有意な上昇となった。特異的 siRNA によるカスパーゼ-6 ノックダウン細胞では、抗 Fas 抗体単独処理時に比べ減少をしたことを確認した。7A6 抗原はアポトーシス刺激において活性したカスパーゼ経路のカスパーゼ-6 の下流に位置していることと、カスパーゼ-6 のノックダウンでは発現を完全に抑制できなかったためと考えられる。

エフェクターカスパーゼ-6 はアポトーシスを誘導するカスパーゼとして認識されている。

しかしながら、活性化型カスパーゼ-6を導入しただけでは、アポトーシスは誘導されないことが示された。一方で、カスパーゼ-6の阻害はアポトーシスの進行に影響するとの報告があり、本実験でも阻害剤でDNA断片化に対し若干の抑制を確認している。

7A6はカスパーゼ-6に対して制御されることを本研究で見出したが、カスパーゼ-6の基質となるタンパク質も複数報告されている。そこから7A6の候補となるタンパク質を考察してみる(図35)。

カスパーゼ-6の基質はラミンA/Cが有名であり、切断されたラミンA/Cの生成はカスパーゼ-6の活性化の指標として用いられている(103)。分子量はラミンAが50 kDaでありラミンCが41 kDa、切断を受けたラミンは28 kDaとなる。ラミンは核タンパク質であり、切断を受けると核への傷害からアポトーシスが誘導されると考えられている(70, 71)。

ChoらはHAUSP、PARD3、GEP100、SDCCAG3、Kinesin5Bがアポトーシス時にカスパーゼ-6の基質になることを見出した(104)。HAUSPは130 kDaの核タンパク質であり、p53とMDM2の脱ユビキチン化酵素であることが示されている(105)。MDM2はユビキチン化酵素であり、常時p53をユビキチン化しp53の分解を誘導し細胞生存に寄与している。HAUSPは通常、MDM2の脱ユビキチン化に働きMDM2の分解を抑制し細胞生存に働いているが、DNA損傷時にはp53の脱ユビキチン化に働きアポトーシスを誘導することが示された(106)。スタウロスポリンによるアポトーシス誘導時にはカスパーゼ-6によってHAUSPは切断されることが示されたことによって、p53の活性化およびアポトーシスが誘導されることが示唆された(105)。

PARD3は分子量125 kDaのタンパク質であり、アポトーシス時に核で発現上昇することが示され、Aktの抑制、p38とカスパーゼの活性化に寄与していることが示されている(107)。

上記のタンパク質は核タンパク質であり7A6を比較すると、7A6は38 kDaのサイトゾルに局在しているタンパク質であり、アポトーシス時にミトコンドリアに局在移行する(92)。したがって局在場所と分子量が一致しない。

GEP100は癌の分子マーカーとして用いられ癌の浸潤と転移で中心的な役割を担っていることが報告されている。分子量は121 kDaであり細胞膜で発現している(108)。

SDCCAG3は酵母ツーハイブリット法により大腸癌血清抗原として同定され、細胞分裂時に中心体に局在することが示された(109)。SDCCAG3の分子量は19 kDaでありGEP100とともに局在場所、分子量と一致しない。

Kinesin5Bは、37 kDaの微小管に沿って小胞を輸送する微小管関連運動タンパク質である(110)。特にリソソームへの輸送を担っており、ミトコンドリアへの輸送は担っていないことが示唆された(110)。よってアポトーシス時にミトコンドリアに局在する7A6とは異なる。

カスパーゼ-6は神経変性疾患時に特に活性化が認められ、アルツハイマー病、ハンチントン病に深くかかわっていると考えられている。アルツハイマー病ではアミロイドβとタウがカスパーゼ-6の基質となることが報告されている。さらにカスパーゼ-6に切断を受け

るとミトコンドリアに移行し、ミトコンドリア傷害からアポトーシスを誘導することが示唆された(111)。アミロイド β は 5 kDa の細胞膜局在タンパク質でありタウは核膜に局在する約 56 kDa のタンパク質であるが特定の位置で切断を受けると約 36 kDa になる。ハンチントン病では、カスパーゼ-6 はハンチンチンを分解することでハンチントン病を進行させていることが示唆されている。ハンチンチンは 350 kDa のタンパク質であり、切断を受けると 85 kDa となる。通常は核に局在しているがハンチントン病モデルではミトコンドリアに局在していることが示された(112)。上記のタンパク質は 7A6 のミトコンドリア局在の特徴と一致する。さらにタウの切断を受けたミトコンドリア移行時の分子量は 36 kDa と 7A6 とほぼ等しい。しかしながら、7A6 は細胞膜、核には局在しないことが観察されている。

カスパーゼ-6 はアポトーシスの誘導だけでなくオートファジー関連タンパク質の p62 と Atg3 も切断しオートファジーを抑制していることが示されている(113)。しかしながらカスパーゼ-3 によっても切断されることも示された。7A6 はカスパーゼ-3 を必要としないことを証明した。よって p62 および Atg3 と 7A6 は同一ではなく、オートファジー関連でもないことも示唆された。

アポトーシス時にミトコンドリアに局在移行するタンパク質は Bcl-2 ファミリータンパク質が有名である。カスパーゼ-8 が活性化すると 22 kDa の Bid を切断し 15 kDa の tBid に切断生成する。

Bak と Bax もサイトゾルからミトコンドリアに局在移行する(114)。Bak は 25 kDa であり Bax は 20 kDa である。アポトーシスの刺激が加わるとミトコンドリア膜へ局在移行し、多量体を形成後 MPT 細孔の形成からアポトーシス促進因子の放出を誘導する(114)。

Bok(BCL-2 related ovarian killer)は 23 kDa(115)、Bim (BCL-2 interacting mediator)は 23, 15, 12 kDa(116)、PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis)は 23 kDa(117)、Bik (BCL-2 interacting killer)は 20 kDa(118)、BAD (BCL-2 associated death promoter)は 23 kDa(119)、BMF (BCL-2 modifying factor) は 21 kDa(120)、NOXA (NADPH oxidase activator)は 10 kDa であり(121)、Bak と Bax と同様にミトコンドリアに局在移行する。しかしながら機能は多量体を形成し、MMP 形成からアポトーシスを誘導するのではなく Bak や Bax の活性化や Bcl-2 や Bcl-xL などのアポトーシス抑制がを抑制しアポトーシスを進行させることが示唆されている。アポトーシス促進型の Bcl-2 ファミリータンパク質は 7A6 と挙動が似ているが、分子量の点では 7A6 とはほかのタンパク質であると考えられる。

7A6 とカスパーゼ-6 との経路を考察すると、Zhang らは Apo2.7 を用いたウェスタンブロット法によって 7A6 は 38 kDa と推定した(90)。しかし 14 kDa と 15 kDa 付近に二つのバンドも確認している。低分子量の二つのバンドは通常状態で多く検出でき、アポトーシス時に減少していることが確認できる。本実験で、7A6 は通常はサイトゾルに局在し、アポトーシス時にミトコンドリアに局在移行することを述べた。したがって、低分子量のバンドも 7A6 と考えると、7A6 は 38 kDa で生成され常時、分解酵素によって分解を受けていると考えられる。アポトーシスの刺激が加わるとカスパーゼ-6 が活性化し 7A6 を分解し

ている酵素を分解し 7A6 は 38 kDa のままで存在でき、ミトコンドリアに局在できると考えた。

7A6 のミトコンドリア局在は DNA の断片化やクロマチンの凝集前に起こるため(90)、カスパーゼ-6 の活性化直後のイベントであり、アポトーシス時にミトコンドリアに局在することから 7A6 はアポトーシスの誘導に寄与していることが示唆された。よって MCF7 細胞などのカスパーゼ-3 の欠損した細胞では代替的なアポトーシスの誘導を行っていると考えられる(図 37)。

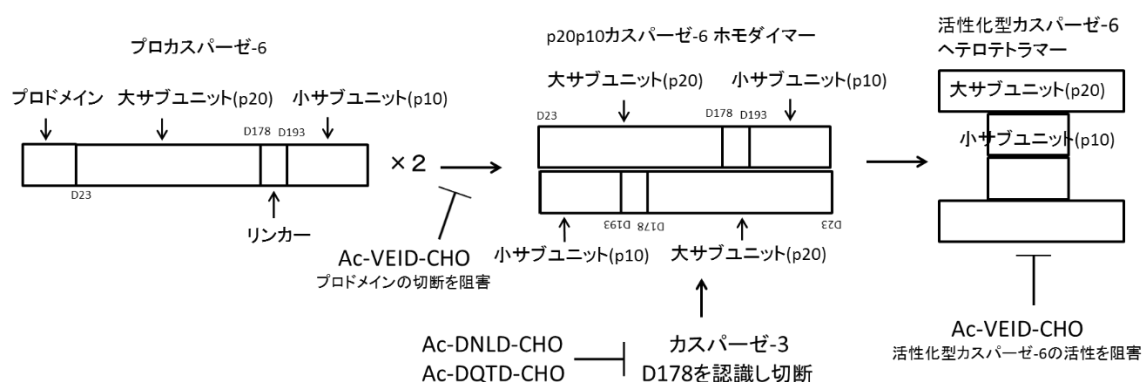


図 34 カスパーゼ-6 の活性化の模式図及び阻害剤の阻害経路図

カスパーゼ-6 阻害剤 Ac-VEID-CHO はプロドメインの切断を阻害しかつヘテロ四量体を阻害している。

7A6候補	分子量(kDa)	局在
ラミンA/C	50/41→28	核
HAUSP	130	核
PARD3	125	核
GEP100	121	細胞膜
SDCCAG3	19	中心体
KInesin5B	37	サイトゾル/リソソーム
アミロイド β	5	細胞膜
タウ	56→36	核
ハンチンチン	350→85	核/ミトコンドリア
Bid→tBid	22→15	サイトゾル/ミトコンドリア
Bak	25	ミトコンドリア
Bax	20	ミトコンドリア
Bok	23	サイトゾル/ミトコンドリア
Bim	23/15/12	サイトゾル/ミトコンドリア
PUMA	23	サイトゾル/ミトコンドリア
Bik	20	サイトゾル/ミトコンドリア
Bad	23	サイトゾル/ミトコンドリア
Bmf	21	サイトゾル/ミトコンドリア
NOXA	10	サイトゾル/ミトコンドリア

図 35 7A6 の候補タンパク質一覧

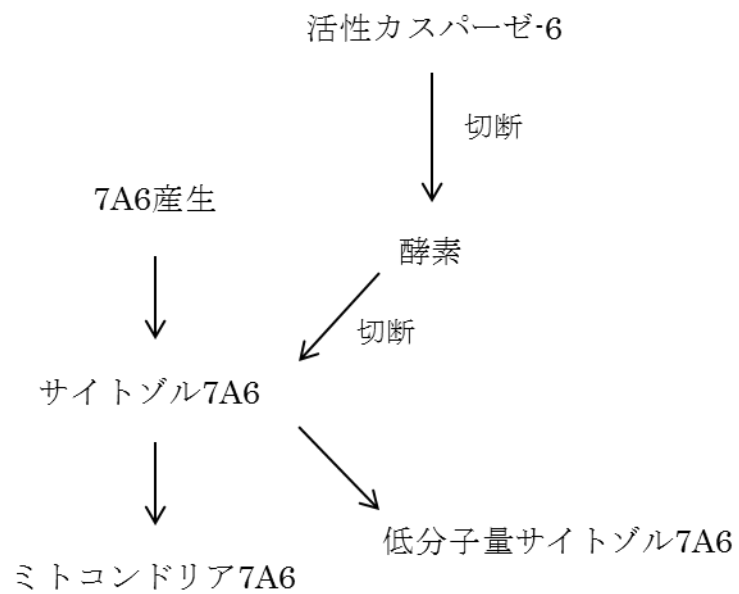


図 36 7A6 とカスパーゼ-6 の経路図の推定

7A6 は通常状態で産生されるが常時、酵素によって切断を受けている。アポトーシスの刺激が加わり、カスパーゼ-6 が活性化し 7A6 を切断している酵素を切断し不活性化せ、切断を受けなくなった 7A6 はミトコンドリアへ局在移行するものと考えられる。

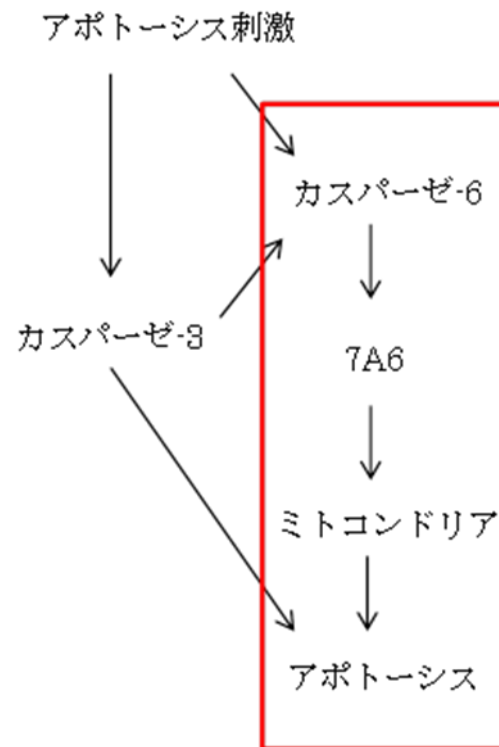


図 37 7A6-カスパーゼ-6 のアポトーシスの概要

アポトーシスはカスパーゼ-3 の活性化をよく伴う。しかしながら、本研究では 7A6-カスパーゼ-6 経路ではカスパーゼ-3 非依存経路によってアポトーシスの誘導が可能である。

謝辞

本研究を遂行するにあたって、多くの方々にお世話になりました。この場をお借りして感謝の意を述べさせていただきたいと思います。

本論文の指導教官であり主査の東京電機大学教授長原礼宗先生には、本研究の実施の機会、研究の進め方についてご指導いただくとともに、聞く人に伝わる研究発表、読む人に伝わる論文の執筆についても詳細なご指導をいただきました。ここに感謝の意を表する。

また副査をしていただきました東京電機大学教授田中真人先生、東京電機大学特別専任教授刀祢重信先生、東京電機大学准教授根本航先生、そして協力員の四宮貴久先生には論文の構成や表現、さらに実験や統計学に関して多くの助言をいただきました。ここに感謝の意を表する。

参考文献

- 1) Clarke PG, Clarke S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol.* 193(2):81-99, 1996.
- 2) Saunders JW Jr. Death in embryonic systems. *Science.* 154(3749):604-612, 1996.
- 3) Lockshin RA. Programmed cell death 50 (and beyond). *Cell Death Differ.* 23(1):10-17, 2016.
- 4) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26(4):239-257, 1972.
- 5) Sulston JE. *C. elegans*: the cell lineage and beyond. *Biosci Rep.* 23(2-3):49-66, 2003.
- 6) Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 129(1):79-94, 1991
- 7) Yuan JY, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol.* 138(1):33-41, 1990.
- 8) Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 1(2):112-119, 2005.
- 9) Susan E. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495–516, 2007.
- 10) Egle A, Harris AW, Bath ML, O'Reilly L, Cory S. VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood.* 103(6):2276-2283, 2004
- 11) Zinkel SS, Hurov KE, Ong C, Abtahi FM, Gross A, Korsmeyer SJ. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell.* 122(4):579-591, 2005.
- 12) Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O. Prognostic significance of Bcl-2 in invasive mammary carcinomas: a comparative clinicopathologic study between "triple-negative" and non-"triple-negative" tumors. *Hum Pathol.* 43(1):23-30, 2012.
- 13) Madkaikar M, Mhatre S, Gupta M, Ghosh K. Advances in autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Eur J Haematol.* 87(1):1-9, 2001.
- 14) Halder UC, Bagchi P, Chattopadhyay S, Dutta D, Chawla-Sarkar M. Cell death regulation during influenza A virus infection by matrix (M1) protein: a model of viral control over the cellular survival pathway. *Cell Death Dis.* 2:e197, 2011.
- 15) Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* 457(7232):981-989, 2009.
- 16) Machado NG, Alves MG, Carvalho RA, Oliveira PJ. Mitochondrial involvement in cardiac apoptosis during ischemia and reperfusion: can we close the box? *Cardiovasc*

Toxicol. 9(4):211-227, 2009.

17) Christopher DG, Andrew D. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology*. 113(1):1-14, 2004.

18) Tamegai H, Takada Y, Okabe M, Asada Y, Kusano K, Katagiri YU, Nagahara Y. *Aureobasidium pullulans* culture supernatant significantly stimulates R-848-activated phagocytosis of PMA-induced THP-1 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 35(4):455-461, 2013.

19) Chai J, Shi Y. Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. *Natl Sci Rev*. 1(1):101-118, 2014.

20) Denecker G, Hoste E, Gilbert B, Hocheplied T, Ovaere P, Lippens S, Van den Broecke C, Van Damme P, D'Herde K, Hachem JP, Borgonie G, Presland RB, Schoonjans L, Libert C, Vandekerckhove J, Gevaert K, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol*. 9(6):666-674, 2007.

21) Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(15):7464-7469, 1996.

22) Mohamed L, Thirumala-Devi K. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 42(1):21-24, 2010.

23) Klaiman G, Champagne N, LeBlanc AC. Self-activation of Caspase-6 in vitro and in vivo: Caspase-6 activation does not induce cell death in HEK293T cells. *Biochim Biophys Acta*. 1793(3):592-601, 2009.

24) Zhaoyu J, Wafik S. ED. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology and Therapy* 4(2):139-163, 2005.

25) Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*. 76(6):969-976, 1994.

26) Rebekka S, Kathrin S, Anna L, Judith T, Oliver S, Michael E, Irmgard M. Modeling the TNF α -induced apoptosis pathway in hepatocytes. *PLoS ONE*. 6(4):e18646, 2011.

27) Eddie CYW. On death receptor 3 and its ligands.... *Immunology*. 137(1): 114-116, 2012.

28) Tang Z, Bauer JA, Morrison B, Lindner DJ. Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4. *Mol Cell Biol*. 26(15):5588-5594, 2006

29) Graves JD, Kordich JJ, Huang TH, Piasecki J, Bush TL, Sullivan T, Foltz IN4, Chang W, Douangpanya H, Dang T, O'Neill JW, Mallari R, Zhao X, Branstetter DG,

- Rossi JM, Long AM, Huang X, Holland PM. Apo2L/TRAIL and the death receptor 5 agonist antibody AMG 655 cooperate to promote receptor clustering and antitumor activity. *Cancer Cell*. 26(2):177-189, 2014.
- 30) Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*. 14(6):1129–1135, 1995.
- 31) Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas Ligand Kills Human Peripheral Blood T Lymphocytes, and Soluble Fas Ligand Blocks the Killing. *J Exp Med*. 186(12):2045-2050, 1997.
- 32) Silvia GC, María-José LA, Carmen GG, Dolores S, Almudena GS, Arturo OG, Eric GN. Jesús E. Anti-Fas antibodies induce cytolysis and apoptosis in cultured human mesangial cells. *Kidney International*. 49:1064-1070, 1996.
- 33) Fiona LS, Boguslaw S, Cristina P, Małgorzata KD, JeongEun JL, Edward M, Howard R, Guy SS, Robert S, Stefan JR. The Fas/FADD death domain complex structure unravels signaling by receptor clustering. *Nature*. 457(7232): 1019-1022, 2009.
- 34) Nils H, Aubry T, Magdalena KB, Sylvie H, Olivier G, Fabio M, Antoine T, David D, Silvio C, Therese S, Jürgen E, Pascal S, Jürg T. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*. 23(4):1428–1440, 2003.
- 35) Shah S, Wu E, Rao VK, Tarrant TK. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an update and review of the literature. *Curr Allergy Asthma Rep*. 14(9):462, 2014.
- 36) Julia CH, Alexander P, Peter HK, Inna NL. A new C-terminal cleavage product of procaspase-8, p30, defines an alternative pathway of procaspase-8 activation. *Mol Cell Biol*. 29(16):4431-4440, 2009.
- 37) Teliëps T, Ewald F, Gereke M, Annemann M, Rauter Y, Schuster M, Ueffing N, von Smolinski D, Gruber AD, Bruder D, Schmitz I. Cellular-FLIP, Raji isoform (c-FLIP R) modulates cell death induction upon T-cell activation and infection. *Eur J Immunol*. 43(6):1499-1510, 2013.
- 38) Lavrik IN Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*. 19(1):36-41, 2012.
- 39) Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*. 1366(1-2):139-149, 1998.
- 40) Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 23(16):2861-2874, 2004.
- 41) Shawn B. Bratton, Guy S. Salvesen. Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome.

J Cell Sci. 123:3209-3214, 2010.

42) van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 9(1):20-26, 2002.

43) Kim HE, Du F, Fang M, Wang X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(49):17545-17750, 2005.

44) Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.* 20(5):998-1009, 2001.

45) Chao Y, Shiozaki EN, Srinivasula SM, Rigotti DJ, Fairman R, Shi Y. Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol.* 3(6):e183, 2005.

46) Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell.* 11(2):529-541, 2003.

47) Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(25):14250-14245, 2001.

48) Malladi S, Challa-Malladi M, Fearnhead HO, Bratton SB. The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *EMBO J.* 28(13):1916-1925, 2009.

49) Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 269(49):30761-30764, 1994.

50) Laurence Dubrez, Isabelle Savoy, Arlette Hamman and Eric Solary. Pivotal role of a DEVD-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways. *The EMBO Journal.* 15(20):5504-5512, 1996

51) Kavanagh E, Rodhe JM, Burguillos A, Venero JL, Joseph B. Regulation of caspase-3 processing by cIAP2 controls the switch between pro-inflammatory activation and cell death in microglia. *Cell Death and Disease.* e1565, 2014.

52) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, KOKAWA K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.

Nature. 391(6662):43-50, 1998.

53) Sakahira H, Enari M, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S. Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr Biol.* 9(10):543-546, 1999.

54) Itoh T, Horio T. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is cleaved during UV-induced apoptosis. *J Dermatol Sci.* 25(1):72-77, 2001.

55) Rhéaume E, Cohen LY, Uhlmann F, Lazure C, Alam A, Hurwitz J, Sékaly RP, Denis F. The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* 16(21):6346-5463, 1997.

56) Samejima K, Svingen PA, Basi GS, Kottke T, Mesner PW Jr, Stewart L, Durrieu F, Poirier GG, Alnemri ES, Champoux JJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem.* 274(7):4335-4340, 1999.

57) Kumar S. Caspase-mediated changes in histone H1 in early apoptosis: prolonged caspase activation in developing olfactory sensory neurons. *Cell Death and Differentiation.* 15(9):1429-1439, 2008.

58) Casciola-Rosen LA, Miller DK, Anhalt GJ, Rosen A. Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 269(49):30757-30760, 1994.

59) Pochampally R, Fodera B, Chen L, Shao W, Levine EA, Chen J. A 60 kd MDM2 isoform is produced by caspase cleavage in non-apoptotic tumor cells. *Oncogene.* 17(20):2629-2636, 1998.

60) Geng YJ, Azuma T, Tang JX, Hartwig JH, Muszynski M, Wu Q, Libby P, Kwiatkowski DJ. Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol.* 77(4):294-302, 1998.

61) de Boer RA, van Veldhuisen DJ, van der Wijk J, Brouwer RM, de Jonge N, Cole GM, Suurmeijer AJ. Additional use of immunostaining for active caspase 3 and cleaved actin and PARP fragments to detect apoptosis in patients with chronic heart failure. *J Card Fail.* 6(4):330-337, 2000.

62) Maravei DV, Trbovich AM, Perez GI, Tilly KI, Banach D, Talanian RV, Wong WW, Tilly JL. Cleavage of cytoskeletal proteins by caspases during ovarian cell death: evidence that cell-free systems do not always mimic apoptotic events in intact cells. *Cell Death Differ.* 4(8):707-712, 1997.

63) Brentnall M, Rodriguez ML, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.*

14(32):14: 32, 2013.

64) Boucher D, Blais V, Denault JB. Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(15):5669-5674, 2012.

65) Elizabeth AS, Colin A Seamus J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 276(10):7320-7326, 2001.

66) Timmer JC Salvesen GS. Caspase substrates. *Cell Death Differ*. 14(1):66-72, 2007.

67) Allsopp TE, McLuckie J, Kerr LE, Macleod M, Sharkey J, Kelly JS. Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis. *Cell Death Differ*. 7(10):984-993, 2000.

68) Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res*. 7(5):1474-1480, 2001.

69) Schmeck B, Gross R, N'Guessan PD, Hocke AC, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. *Streptococcus pneumoniae*-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. *Infect Immun*. 72(9):4940-4947, 2004.

70) Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med*. 187(4):587-600, 1998.

71) Shahzidi S, Brech A, Sioud M, Li X, Suo Z, Nesland JM, Peng Q. Lamin A/C cleavage by caspase-6 activation is crucial for apoptotic induction by photodynamic therapy with hexaminolevulinate in human B-cell lymphoma cells. *Cancer Lett*. 339(1):25-32, 2013.

72) Licht V1, Noack K, Schlott B, Förster M, Schlenker Y, Licht A, Krämer OH, Heinzel T. Caspase-3 and caspase-6 cleave STAT1 in leukemic cells. *Oncotarget*. 5(8):2305-2317, 2014.

73) Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J*. 22(24):6537-6549, 2003.

74) Joanna M. Norman, Gerald M. Cohen, Edward T.W. Bampton. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy*. 6(8):1042-1056, 2010.

75) Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Bertram L, Murphy Z, Warby SC, Doty CN, Roy S, Wellington CL, Leavitt BR, Raymond LA, Nicholson DW, Hayden MR. Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell*. 125(6):1179-1191, 2006.

76) LeBlanc A, Liu H, Goodyer C, Bergeron C, Hammond J. Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *J Biol Chem*.

274(33):23426-23436, 1999.

77) Albrecht S, Bogdanovic N, Ghetti B, Winblad B, LeBlanc AC. Caspase-6 activation in familial alzheimer disease brains carrying amyloid precursor protein or presenilin I or presenilin II mutations. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68(12):1282-1293, 2009.

78) Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC. Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 165(2):523-531, 2004.

79) Ehrnhoefer DE, Skotte NH, Ladha S, Nguyen YT, Qiu X, Deng Y, Huynh KT, Engemann S, Nielsen SM, Becanovic K, Leavitt BR, Hasholt L, Hayden MR. p53 increases caspase-6 expression and activation in muscle tissue expressing mutant huntingtin. *Hum Mol Genet.* 23(3):717-729, 2014.

80) Harris G. Antibody production in vitro. The effects of anti-allotypic serum on the secondary response of rabbit spleen cell suspensions to sheep erythrocytes (SRC). *Immunology.* 17(6):911-926, 1969.

81) Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Gorham J, Nowell PC, Croce CM. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature.* 315(6017):340-343, 1985.

82) Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 335(6189):440-442, 1988.

83) Tsujimoto Y. Overexpression of the human BCL-2 gene product results in growth enhancement of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(6):1958-1962, 1989.

84) Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ.* 13(8):1339-1350, 2006.

85) Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 8(8):324-330, 1998.

86) Hirota M, Zhang Y, Fujita N, Naito M, Tsuruo T. NH2-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *J Biol Chem.* 274(29):20415-20420, 1999.

87) Keith G, Wolter, Yi-Te Hsu, Carolyn L. Smith, Amotz Nechushtan, Xu-Guang Xi, and Richard J. Youle. Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *J Cell Biol.* 139(5):1281-1292, 1997.

88) Ferrer PE, Frederick P, Gulbis JM, Dewson G, Kluck RM. Translocation of a Bak C-terminus mutant from cytosol to mitochondria to mediate cytochrome C release: implications for Bak and Bax apoptotic function. *PLoS One.* 7(3):e31510, 2012.

89) Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the

- mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94(4):491-501, 1998.
- 90) Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol*. 157(9):3980-3987, 1996.
- 91) Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*. 3(2):115-121, 1998.
- 92) Ngahara Y, Tnaka M, Shinomiya T. Mechanism of mitochondrial 7A6 antigen exposure triggered by distinct apoptotic pathways: Involvement of caspases. *Cytometry Part A* 71A:232-241, 2007.
- 93) Mareková M, Vávrová J, Vokurková D. Monitoring of premitotic and postmitotic apoptosis in gamma-irradiated HL-60 cells by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Gen Physiol Biophys*. 22(2):191-200, 2003.
- 94) Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*. 273(49):32608-32613, 1998.
- 95) Yoshimori A, Sakai J, Sunaga S, Kobayashi T, Takahashi S, Okita N, Takasawa R, Tanuma S. Structural and functional definition of the specificity of a novel caspase-3 inhibitor, Ac-DNLD-CHO. *BMC Pharmacol*. 27;7:8, 2007.
- 96) Cowling V, Downward J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ*. 9(10):1046-56, 2002.
- 97) Guo W, Zhang Y, Ling Z, Liu X, Zhao X, Yuan Z, Nie C, Wei Y. Caspase-3 feedback loop enhances Bid-induced AIF/endoG and Bak activation in Bax and p53-independent manner. *Cell Death Dis*. 6:e1919, 2015.
- 98) Kuželová K, Grebeňová D, Brodská B. Dose-dependent effects of the caspase inhibitor Q-VD-OPh on different apoptosis-related processes. *J Cell Biochem*. 112(11):3334-3342, 2011.
- 99) Büssing A, Vervecken W, Wagner M, Wagner B, Pfüller U, Schietzel M. Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry*. 37(2):133-9, 1999.
- 100) Hamatake M, Iguchi K, Hirano K, Ishida R. Z Zinc induces mixed types of cell death, necrosis, and apoptosis, in molt-4 cells. *J Biochem*. 128(6):933-9, 2000.
- 101) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and

- specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 19;391(6669):806-811, 1998.
- 102) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411(6836):494-498, 2001.
- 103) Shahzidi S, Brech A, Sioud M, Li X, Suo Z, Nesland JM, Peng Q. Lamin A/C cleavage by caspase-6 activation is crucial for apoptotic induction by photodynamic therapy with hexaminolevulinate in human B-cell lymphoma cells. *Cancer Lett*. 339(1):25-32, 2013.
- 104) Cho JH, Lee PY, Son WH, Chi SW, Park BC, Kim JH, Park SG. Identification of the novel substrates for caspase-6 in apoptosis using proteomic approaches. *BMB Rep*. 46(12): 588–593, 2013.
- 105) Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*. 416(6881):648-53, 2002.
- 106) Tavana OI, Gu W. Modulation of the p53/MDM2 interplay by HAUSP inhibitors. *J Mol Cell Biol*. 9(1):45-52, 2017.
- 107) Sakagami H, Hara Y, Fukaya M. Interaction of serologically defined colon cancer antigen-3 with Arf6 and its predominant expression in the mouse testis. *Biochem Biophys Res Commun*. 477(4):868-73, 2016.
- 108) Lei H, Xu Y, Guan R, Li M, Hui Y, Gao Z, Yang B, Xin Z. Effect of gyromagnetic fields on human prostatic adenocarcinoma cells. *Onco Targets Ther*. 8:3489-97, 2015.
- 109) Yu F, Sharma S, Skowronek A, Erdmann KS. The serologically defined colon cancer antigen-3 (SDCCAG3) is involved in the regulation of ciliogenesis. *Sci Rep*. 6:35399, 2016.
- 110) Pandruvada SN, Beauregard J, Benjannet S, Pata M, Lazure C, Seidah NG, Vacher J. Role of Ostml Cytosolic Complex with Kinesin 5B in Intracellular Dispersion and Trafficking. *Mol Cell Biol*. 36(3):507-21, 2015.
- 111) Reddy PH. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1415:136-48, 2011.
- 112) Yano H, Baranov SV, Baranova OV, Kim J, Pan Y, Yablonska S, Carlisle DL, Ferrante RJ, Kim AH, Friedlander RM. Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nat Neurosci*. 17(6):822-31, 2014.
- 113) Norman JM, Cohen GM, Bampton ET. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy*. 6(8):1042-56, 2010.

- 114) Frank E. The great migration of Bax and Bak. *Mol Cell Oncol.* 2(3): e995029, 2015.
- 115) Echeverry N, Bachmann D, Ke F, Strasser A, Simon HU, Kaufmann T. Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death Differ.* 20(6):785-99, 2013.
- 116) O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 17(2):384-95, 1998.
- 117) Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene. Suppl* 1:S71-83, 2008.
- 118) Jiang A, Clark EA. Involvement of Bik, a proapoptotic member of the Bcl-2 family, in surface IgM-mediated B cell apoptosis. *J Immunol.* 166(10):6025-33, 2001.
- 119) Howells CC, Baumann WT, Samuels DC, Finkielstein CV. The Bcl-2-associated death promoter (BAD) lowers the threshold at which the Bcl-2-interacting domain death agonist (BID) triggers mitochondria disintegration. *J Theor Biol.* 271(1):114-23, 2011.
- 120) Hausmann M, Leucht K, Ploner C, Kiessling S, Villunger A, Becker H, Hofmann C, Falk W, Krebs M, Kellermeier S, Fried M, Schölmerich J, Obermeier F, Rogler G. BCL-2 modifying factor (BMF) is a central regulator of anoikis in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 286(30):26533-40, 2011.
- 121) Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 288(5468):1053-1058, 2000.